UNTERSUCHUNGEN ÜBER ALTERS- UND LICHTABHÄNGIGKEIT DES KOHLENSTOFFEINBAUS IN PILZMYZELIEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Farida Tawfik EL-HISSY

aus Kafr El-Tera, Dakahlia (Ägypten)

1968

UNTERSUCHUNGEN ÜBER ALTERS- UND LICHTABHÄNGIGKEIT DES KOHLENSTOFFEINBAUS IN PILZMYZELIEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Farida Tawfik EL-HISSY

aus Kafr El-Tera, Dakahlia (Ägypten)

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dez. 1968

Dekan: Prof. Dr. H. Blume

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Metzner

2. Berichterstatter: Doz. Dr. W. Löffler

Gedruckt mit Unterstützung

des Deutschen Akademischen Austauschdienstes

Diese Arbeit ist meinem lieben Vater gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547604_0110

GLIEDERUNG

	Seite
I. Einleitung	2
II. Methodik	3
a) Anzucht der Versuchsobjekte	3
b) Trockengewichtsbestimmung	5
c) Bestimmung der $^{14}CO_2$-Fixierung	6
d) Identifizierung der Fixierungsprodukte	7
III. Experimenteller Teil	10
A. Vorversuche	10
B. Hauptversuche	16
^{14}C-Einbau nach verschiedenen Fixierungszeiten.....	16
^{14}C-Einbau in verschiedenen Phasen des Wachstums	24
Lichtabhängigkeit der $^{14}CO_2$-Fixierung	37
IV. Diskussion	42
Zusammenfassung	50
Literatur	57

I. EINLEITUNG

Bereits 1927 haben unabhängig voneinander RIPPEL und BORTELS sowie ROCKWELL und HIGHBERGER festgestellt, daß Pilzmyzelien nur in Gegenwart von CO_2 wachsen. Mehrere Arbeiten bestätigten diesen Befund (vgl. NIEDERPRUEM 1965). Zwanzig Jahre später wurde die Verwendung von radioaktivem CO_2 zur Untersuchung des Kohlenstoffeinbaus, insbesondere bei grünen Pflanzen, eingeführt (BENSON und CALVIN 1947, GAFFRON und Mitarbeiter 1947). Diese Technik erlaubt es, die Intermediärprodukte und die unterschiedlichen Wege der CO_2-Fixierung bei verschiedenen Organismen und unter Berücksichtigung zahlreicher Variabler zu studieren. Daß das Einbaumuster des ^{14}C im Verlaufe der Zellentwicklung keineswegs konstant ist, wurde von mehreren Autoren erkannt (vgl. z.B. STANGE und Mitarbeiter 1960, SHKOLNIK und Mitarbeiter 1965, AHMED 1968).

Auch bei Heterotrophen wurden Experimente mit $^{14}CO_2$ gemacht, um die Einbaumuster zu charakterisieren, doch wurden bei diesen Versuchen nur selten Pilze eingesetzt. STOPPANI und Mitarbeiter (1958) verfolgten den C-Einbau bei der Hefe nach verschiedenen Fixierungszeiten; andere Autoren (vgl. GOTTLIEB 1966) beschäftigten sich mit keimenden Sporen. Ergänzende Informationen verdanken wir einigen Arbeiten, in denen zwar kein radioaktiver Kohlenstoff eingesetzt, in denen aber die Mengenverhältnisse einzelner Aminosäuren in den verschiedenen Wachstumsphasen von Aspergillus usamii untersucht wurden (KOTOV und Mitarbeiter 1965).

Für Autotrophe ist wiederholt gezeigt worden, daß das Einbaumuster der $^{14}CO_2$-Fixierung im Blaulicht anders aussieht als im Rotlicht. Nach OGASAWARA und MIYACHI (1968)

beeinflußt die Lichtqualität die Carboxylierung C_3 + C_1. Diese Carboxylierung dürfte bei Pilzen den Hauptweg der C-Fixierung einleiten (STOPPANI und Mitarbeiter 1957); andererseits ist mehrfach ein unterschiedlicher Einfluß des roten und des blauen Spektralbereiches auf Entwicklungsvorgänge bei Pilzen nachgewiesen worden (vgl. LILLY 1966). Über die Beeinflussung des C-Einbaumusters durch die Lichtqualität liegen aber bis heute keine Mitteilungen vor.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die eingehende Untersuchung der $^{14}CO_2$-Fixierung bei Pilzen in Abhängigkeit von der Fixierungszeit und vom Entwicklungszustand der Myzelien sowie die Suche nach einem möglichen Einfluß roten und blauen Lichtes auf den Weg des Kohlenstoffeinbaus.

II. METHODIK

a) Anzucht der Versuchsobjekte: Als Versuchsobjekte wurden Isaria cretacea [1] (Fungi imperfecti, Deuteromycetes) und Neurospora crassa (Ascomycetes) verwendet. Von Neurospora konnte außer dem Normalstamm eine Argininheterotrophe Mutante (A 407 arg-1) eingesetzt werden [2]. Die Pilze wurden auf folgenden Nährlösungen gezüchtet:

---

1) 1963 durch EL HISSY und Prof. MOUBASHER in der Nähe Assiut aus dem Nil-Wadi isoliert.

2) Die beiden Neurospora-Stämme wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. ZÄHNER (Institut für Biologie der Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

a) Isaria:

Glucose	10,0 g
$NaNO_3$	2,0
KH_2PO_4	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
KCl	0,5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01
Hefeextrakt	0,5
Aqua dest.	1000 ml

b) Neurospora:

Glucose	20,0 g
NH_4Cl	5,0
K_2HPO_4	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	20,0 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,0
Inosit	100,0 ug
Biotin	10,0
Aqua dest.	1000 ml

Für die Anzucht der Arginin-heterotrophen Neurospora-Mutante wurde der Nährlösung pro Liter 5,0 g Arginin zugegeben. Die Medien wurden 20 min bei 120°C autoklaviert.

Die Pilze wurden zunächst 10 Tage auf Schrägagarröhrchen (jeweilige Nährlösung + 1,5% Difco-Agar) angezogen. Danach wurden Sporensuspensionen gewonnen, die mit Hilfe eines "Dipper" (1 ml) abgeimpft wurden.

Diese Dipper-Methode ermöglicht die gleichmässige Verteilung der Sporen auf die Schalen bzw. Kolben (MENZIES 1957, WATSON 1960, MOUBASHER 1963). Für Isaria erwiesen sich Petrischalen (10 cm Durchmesser) als besonders geeignet; sie gewährleisten eine gleichmässige Belichtung der Oberfläche. Die Verwendung der Nährlösung erleichterte die Abtrennung der Mycelien durch Filtration. Nach der Beimpfung wurden die Schalen in einer thermostatisierten Beleuchtungsanlage (vgl. SIEFERMANN 1967) bei 23 ($\pm$ 1)^{o}C inkubiert. Da bekannt ist, daß der Wachstumsverlauf von Isaria durch Licht beeinflußt werden kann (TABER und VINING 1959), wurde der Zuwachs bei verschiedenen Belichtungsprogrammen (Dauerlicht, Dauerdunkel, Licht-Dunkel-Wechsel) untersucht. Als besonders günstig erwies sich ein Licht-Dunkel-Wechsel von 8 : $\overline{16}$ (Dunkelstunden überstrichen) Stunden. Die Beleuchtung (20 000 Lux) erfolgte dabei durch eine Kombination von Leuchtstoffröhren (4 x TL 40 W/77 (Osram)).

Für die Anzucht von Neurospora waren Erlenmeyerkolben (100 ml) besser geeignet. Jeder Kolben wurde mit 20 ml Nährlösung beschickt, beimpft und auf einer rotierenden Schüttelmaschine (110 U/min) bei 28^{o}C inkubiert.

Alle 24 Stunden wurden einige Petrischalen bzw. Erlenmeyerkolben entnommen, die Myzelien geerntet und für die Versuche verwendet.

b) Trockengewichtsbestimmung: Zur Ermittlung des Trockengewichts wurden die Myzelien aus je 3 Petrischalen bzw. Erlenmeyerkolben auf vorgewogenes Filtrierpapier abgenutscht, zweimal mit Aqua dest. gewaschen und bei 105^{o}C in einem gewogenen Glastiegel bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Vor der Wägung wurden die Glastiegel in einem Exsikkator abgekühlt. Die im experimentellen Teil angegebenen Trockengewichte stellen Mittelwerte aus je drei

Einzelwägungen dar.

c) Bestimmung der $^{14}CO_2$-Fixierung: Die Myzelien aus einer Petrischale bzw. einem Erlenmeyerkolben wurden mit einem Steril-Filtrationsgerät (Stefi 4 der Membranfiltergesellschaft Göttingen) abgenutscht, zweimal mit Phosphatpuffer (0,03 mol, pH 7,2) gewaschen und dann in das Fixierungsgefäß (METZNER 1968) eingebracht. Für das eigentliche Fixierungsexperiment wurden die Myzelien resuspendiert. Dazu wurden sie in 10 ml Phosphatpuffer aufgeschwemmt; mit einer Injektionsspritze wurden dann 0,2 ml einer wässrigen $NaH^{14}CO_3$-Lösung (160 uC/ml) hinzugegeben. Der Puffer mit seinem relativ hohen pH-Wert wurde verwendet, um die Freisetzung von gasförmigem $^{14}CO_2$ möglichst niedrig zu halten (vgl. KANAI und Mitarbeiter 1960, TSAY und Mitarbeiter 1965), nachdem sich in den Vorversuchen (s. unten) gezeigt hatte, daß $^{14}CO_2$ nur langsam aufgenommen wird. Die verwendete Methode (Pilzmyzel + Puffer + $NaH^{14}CO_3$) erwies sich jedenfalls für die Fixierungsexperimente der eingesetzten Pilzstämme besser geeignet.

Bei allen Experimenten zur Lichtfixierung wurden die Myzelien mit einer "Attralux"-Lampe 300 W (Philips) bestrahlt; die Beleuchtungsstärke am Ort des Versuchsobjekts betrug dabei etwa 50 000 Lux.

Um nach der Fixierung eine Vermischung des Puffers mit dem Extraktionsmittel und damit eine Anreicherung von Elektrolyten im eingeengten Pilzextrakt zu vermeiden, wurde der Puffer nach Ablauf der Fixierungszeit unter Vakuum abfiltriert und die Pilzmasse mit Aqua dest. gewaschen. Da nur stabile Intermediärprodukte erfasst werden sollten, wurden die Myzelien durch Einwerfen der Filter in siedendes 85%iges Methanol abgetötet (BASSHAM und CALVIN 1957). 30 Minuten später wurden die extrahierten Myzelien abzentrifugiert und der Rückstand noch zweimal mit 20%igem wässrigen Aceton nachgewaschen. Die vereinigten Extrakte

enthielten dann die Gesamtmenge der wasser- und alkohollöslichen Zellinhaltsstoffe.

Zur Bestimmung der Gesamtfixierung wurden 0,2 ml der Extrakte unter Zusatz eines Tropfens konzentrierter Ameisensäure (zur Entfernung von noch unverbrauchtem Bicarbonat) auf einer Aluminium-Planchette eintrocknen gelassen. Die Aktivität wurde mit einem Methandurchflußzähler (FH 407) in Kombination mit einem automatischen Probenwechsler (FH 448, Frieseke und Hoepfner) gemessen. Aus den erhaltenen Zahlen wurde die Gesamtaktivität der einzelnen Extrakte berechnet.

Zur Ermittlung der Fixierungsrate und der relativen Markierung der verschiedenen Intermediärprodukte im Rot- und Blaulicht fanden Filter mit Transmissionsmaxima bei 640 nm (keine Transmission unterhalb 600 nm) bzw. 450 nm (keine Transmission oberhalb 570 nm) Verwendung. Es erschien wünschenswert, die Filter so auszuwählen, daß im Rot- und Blaulicht gleiche ^{14}C-Fixierungsraten erzielt wurden, ohne daß der Lichtstrom des Projektors verändert werden musste. Als geeignet erwiesen sich schließlich 3 mm dicke Filter der Firma Schott & Genossen, Mainz, und zwar RG 2 für rotes und BG 28 für blaues Licht. Die Filter wurden an einem Projektionsapparat (Leitz Prado 500) mit einer 500 W-Projektionslampe (Philips) und einem Kleinbildkondensor (15 cm) angebracht. Das Wärmeschutzfilter wurde im Gerät belassen (vgl. RIES 1967).

d) Identifizierung der Fixierungsprodukte: Ausgehend von rund 50 ml wurden die Pilzextrakte am Rotationsverdampfer bei ca. 35°C auf 2 ml eingeengt. Jeweils 250 µl davon (entsprechend 7 000 - 12 000 Imp./min) wurden auf Dünnschichtplatten (Kieselgel G. Merck, Schichtdicke 0,2 - 0,3 mm) aufgetragen. Für die zweidimensionale Chromato-

graphie wurden folgende Lösungsmittel verwendet:

1: n-Propanol-Ammoniak-Wasser (6:3:1)
2: Essigsäurepropylester-Ameisensäure-Wasser (11:5:3)

Jedes Fließmittel wurde zweimal bis zur Höhe von 12 cm aufsteigen gelassen. Für das basische System nahm dies ca. 3 h, für das saure System ca. 2 h in Anspruch.

Die völlig getrockneten Platten wurden in eine Hostaphan-Folie RG 15 (Kalle AG) eingeschlagen und dann mit einem Röntgenfilm (Agfa-Gevaert Osray DW) bedeckt. Die photographische Entwicklung erfolgte nach einer Expositionszeit von einer Woche. Die Lage der Schwärzungen wurde auf die Folie übertragen, die Aktivität aller Flecken mit dem Methandurchflußzähler gemessen.

Zur Identifizierung der Fixierungsprodukte wurden die Platten mit verschiedenen Gruppenreagenzien (Ninhydrin, Bromkresolgrün u.a., vgl. STAHL 1967) besprüht. Zuvor waren die vermuteten Inhaltsstoffe unter völlig gleichen Bedingungen aufgetrennt und ein Verteilungsmuster (Abb. 1) erarbeitet worden, das stets die ersten Anhaltspunkte lieferte. Zur endgültigen Identifizierung wurden die radioaktiven Flecken eluiert und mit authentischen Substanzen co-chromatographiert. Deckungsgleichheit zwischen den Farbreaktionen und der Filmschwärzung galt dabei als (vorläufiger) Identitätsbeweis. Im Falle der Aminosäuren Arginin und Ornithin, die mit den genannten Laufmitteln nicht gut voneinander getrennt werden, wurden die Flecke eluiert und auf einer Celluloseschicht mit n-Butanol : Aceton : Diäthylamin : Wasser (10:10:2:5) chromatographiert. Bei diesem zusätzlichen Lauf wurden die beiden Aminosäuren gut voneinander getrennt.

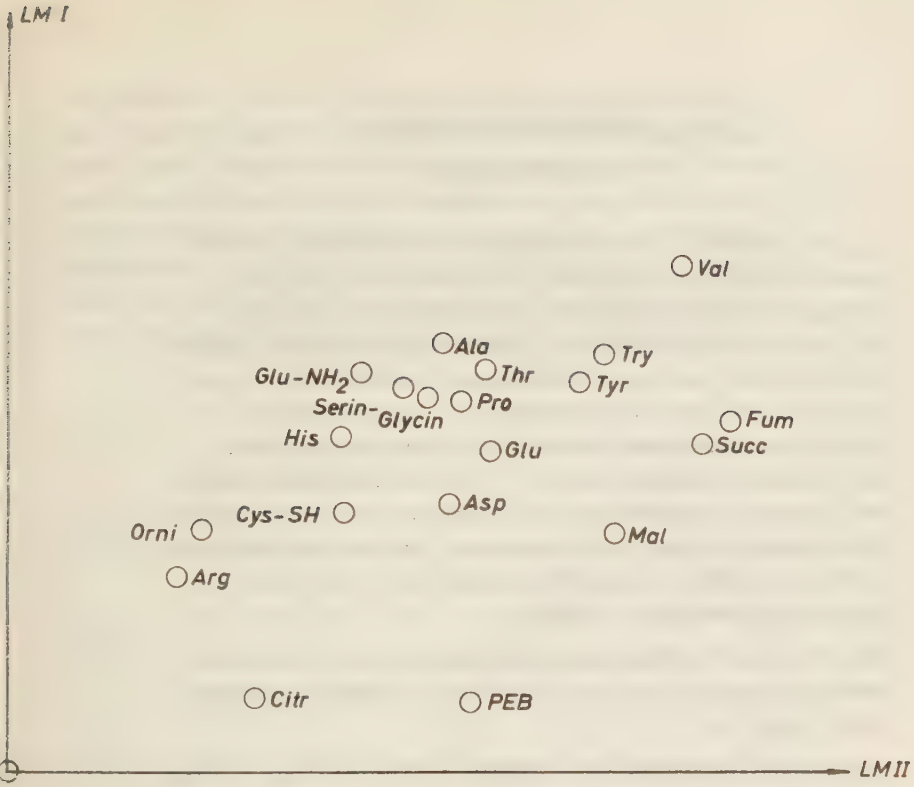


Abb. 1: Lage der wichtigsten ^{14}C-Fixierungsprodukte der untersuchten Pilzmyzelien im zweidimensionalen Dünnschichtchromatogramm

Ala	Alanin	Orni	Ornithin
Arg	Arginin	PEB	Phosphoenolbrenz-traubensäure
Asp	Asparaginsäure		
Citr	Citronensäure	Pro	Prolin
Cys-S-H	Cystein	Ser	Serin
Fum	Fumarsäure	Succ	Bernsteinsäure
Glu	Glutaminsäure	Thr	Threonin
Glu-NH_2	Glutamin	Try	Tryptophan
Gly	Glycin	Tyr	Tyrosin
His	Histidin	Val	Valin
Mal	Äpfelsäure	ZP	Zuckerphosphate

III. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Vorversuche

Es galt zunächst, die Bedingungen festzulegen, unter denen sich die verwendeten Pilzstämme optimal entwickeln. Der Wachstumsverlauf wurde daher im Licht und im Dunkeln untersucht. Eigene Beobachtungen hatten ergeben, daß Isaria im Dauerdunkel anders wächst als im Dauerlicht. Bei einem Vergleich verschiedener Beleuchtungsprogramme erwies sich ein periodischer Licht-Dunkel-Wechsel von 8 : $\overline{16}$ h als besonders geeignet. Unter diesen Bedingungen wachsen die Kolonien sehr gleichmässig heran; die Synnemata erscheinen nach dem 6. Tag. Es zeigte sich, daß Isaria für eine gute Entwicklung Hefeextrakt benötigt.

Wenn man das Trockengewicht im Verlauf des Wachstums verfolgt, erhält man für Isaria eine ideale Wachstumskurve (Abb. 2).

Nach einer Lag-Phase von 2 Tagen findet bis zum 6. Tag rasches Wachstum statt (logarithmische Phase). Im Anschluß an dieses Maximum beobachtet man eine sehr kurze stationäre Phase; anschließend fällt die Kurve wieder ab. Ohne Hefeextrakt ist der Wachstumsverlauf qualitativ gleich, jedoch liegt das Maximum viel niedriger (etwa 1/4, verglichen mit dem der Kontrolle).

Auch die beiden Stämme von Neurospora ergaben normale Wachstumskurven. Die Lag-Phase dauerte bei ihnen aber nur einen einzigen Tag. Danach folgte die logarithmische Phase; das Maximum wurde nach dem 3. Tag erreicht (Abb. 3). Es ist merkwürdig, daß die Mutante ein 7 - 8 mal höheres Trockengewicht erreichte als der Normalstamm. Da die Nährlösung der Mutante zusätzlich Arginin enthielt, war zunächst zu vermuten, daß dieser Zusatz

die Ursache für die grössere Trockengewichtszunahme war. Arginin-Zugabe zum Medium des Normalstammes ergab aber keine signifikante Trockengewichtszunahme. Weiter wurde beobachtet, daß der Normalstamm rein weiß, die Mutante jedoch rötlich-orange gefärbt war. Da Neurospora bekanntlich Carotinoide synthetisieren kann (ZALOKAR 1954, 1955, RAU 1968), ist zu vermuten, daß die Färbung der Mutante durch Carotinoide verursacht wird.

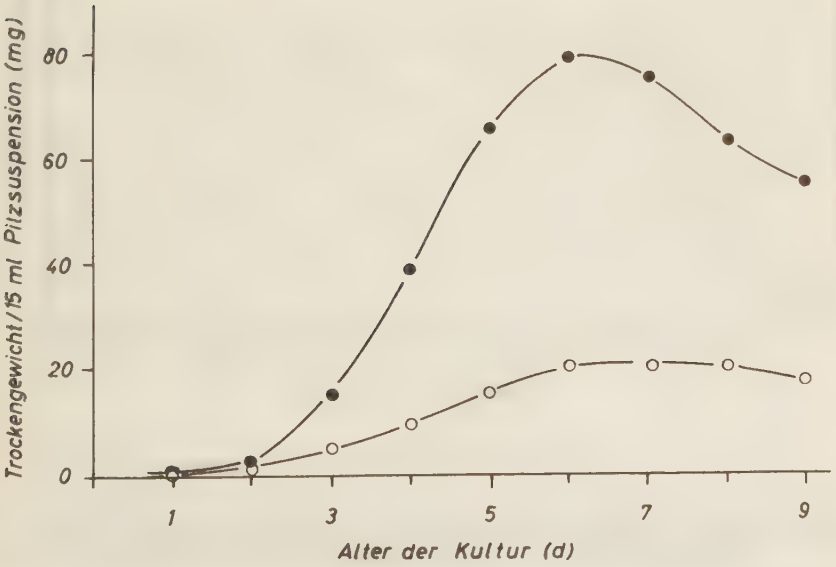


Abb. 2: Wachstumsverlauf (Veränderung des Trockengewichts) einer Isaria-Kultur (Versuchsbedingungen vgl. im Text)

●——● mit Hefeextrakt

○——○ ohne Hefeextrakt

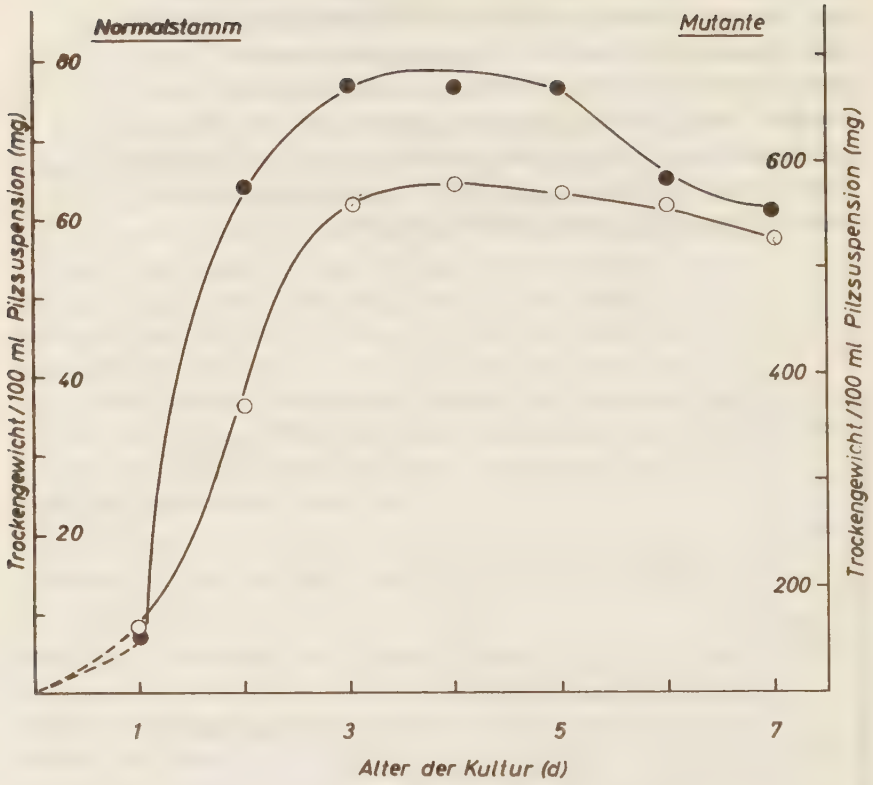


Abb. 3: Wachstumsverlauf (Veränderung des Trockengewichts) von Neurospora-Kulturen (Versuchsbedingungen vgl. im Text)

●——————● Normalstamm

⊙——————⊙ Arginin-heterotrophe Mutante

Im allgemeinen sind die $^{14}CO_2$-Fixierungsraten bei heterotrophen Pflanzen geringer als bei autotrophen. Um bei Pilzen hohe Fixierungsraten zu erzielen, muß daher mit längeren Fixierungszeiten gearbeitet werden. Die Fixierung aus der Gasphase ($NaH^{14}CO_3 + H_2SO_4$) wurde versucht, ergab aber nur verhältnismäßig geringe Fixierungsraten. Daher wurde eine abgewandelte Methode (Pilz + Phosphatpuffer + $NaH^{14}CO_3$) eingesetzt (s. oben).

Tabelle 1 gibt einen Vergleich zwischen den beiden Techniken.

Alter (d)	Isaria		Neurospora	
	$^{14}CO_2$	$NaHCO_3$	$^{14}CO_2$	$NaH^{14}CO_3$
3	54 750	233 000	17 600	37 250
6	43 200	152 000	18 340	40 250

Tabelle 1: ^{14}C-Fixierungsraten (Imp./min) nach 120 min Dunkelfixierung. Vergleich zweier Techniken (Einzelheiten vgl. im Text)

Wegen der zahlreichen Fehlermöglichkeiten bei der Aufarbeitung der Pilze bis zur Auswertung der Autoradiogramme erschien es notwendig, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse vorab zu überprüfen. Deshalb wurden mit beiden Organismen in zwei verschiedenen Entwicklungsstadien (3. und 6. Tag) je drei Fixierungsversuche nebeneinander gemacht. Die Ergebnisse der Parallelversuche stimmten gut miteinander überein (vgl. Tabelle 2a, b).

Produkt	Versuchsreihe I				Versuchsreihe II			
	1	2	3	M+)	1	2	3	M+)
Brenztraubensäure	9,3	8,9	9,7	9,3	9,1	8,7	9,5	9,1
Fumarsäure	18,4	17,9	18,1	18,1	19,4	17,8	18,1	18,4
Äpfelsäure	12,7	11,9	12,4	12,3	26,7	24,3	26,2	25,7
Glutaminsäure	28,3	27,1	29,1	28,2	14,6	14,9	15,9	15,1
Asparaginsäure	8,3	8,7	9,1	8,7	7,8	8,9	8,7	8,3
Serin + Glycin	4,1	4,3	4,7	4,4	2,7	3,1	2,4	2,7
Threonin	2,3	1,9	2,7	2,3	1,6	2,9	0,9	1,8
Arginin-Ornithin	6,3	7,2	6,5	6,7	4,1	5,9	3,2	4,4
Phosphoenol-BTS	4,2	3,9	4,1	4,1	10,4	8,9	9,9	9,7
Zuckerphosphate	4,1	4,9	3,9	4,3	2,8	3,2	3,1	3,0

Tabelle 2a: Reproduzierbarkeit der ^{14}C-Einlagerung in verschiedene Inhaltsstoffe von Isaria (Angaben in Prozent der Gesamtfixierung, Einzelheiten vgl. im Text)

+) M = Mittelwerte

Produkt	Versuchsreihe I				Versuchsreihe II			
	1	2	3	M+)	1	2	3	M+)
Brenztraubensäure	23,2	22,8	23,0	23,0	20,7	18,3	21,2	20,0
Fumarsäure	3,7	3,3	3,4	3,5	13,8	10,2	9,9	11,3
Äpfelsäure	8,3	8,6	8,6	8,5	19,2	17,3	18,4	18,3
Glutaminsäure	9,2	9,1	8,9	9,1	9,1	10,3	9,3	9,6
Asparaginsäure	11,0	11,0	11,3	11,1	7,7	6,6	8,2	7,5
Serin-Glycin	14,1	14,4	14,1	14,2	6,4	8,4	7,8	7,5
Alanin	3,7	3,4	3,4	3,5	7,8	9,8	9,6	9,0
Threonin	10,5	10,9	10,5	10,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Ornithin	8,6	9,0	9,0	8,8	3,9	4,3	4,8	4,3
Phosphoenol-BTS	3,1	2,8	3,2	3,0	4,5	6,1	5,9	5,5
Zuckerphosphate	4,8	4,6	4,8	4,7	5,4	6,9	5,5	5,9

Tabelle 2b: Reproduzierbarkeit der ^{14}C-Einlagerung in verschiedene Inhaltsstoffe von Neurospora-Mutante (Angaben in Prozent der Gesamtfixierung, Einzelheiten vgl. im Text)

+) M = Mittelwerte

B. Hauptversuche

^{14}C-Einbau nach verschiedenen Fixierungszeiten

Nach Abschluß der Vorversuche wurden zunächst Experimente mit verschiedenen Fixierungszeiten durchgeführt. Aus solchen Versuchen lassen sich diejenigen Zeiten ermitteln, nach denen die pools der verschiedenen Intermediärprodukte mit ^{14}C gesättigt sind und der steady state erreicht ist (BASSHAM und CALVIN 1962). Die Proben für die Versuche wurden am 3. Tag (logarithmische Wachstumsphase) entnommen.

Durch quantitative Auswertung der Autoradiogramme wurde die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Intermediärprodukte nach verschiedenen Fixierungszeiten (5, 10, 30, 60, 120 und 180 min) bestimmt. Dabei ergaben sich für die einzelnen Verbindungen unterschiedliche Werte (vgl. Tabellen 3 - 5, vgl. Anhang). Bei Isaria liessen sich besonders starke Veränderungen bei Glutaminsäure, Asparaginsäure und Arginin erkennen (Abb. 4a). Nach 5 oder 10 min Fixierung betrug die relative Glutaminsäuremarkierung 43 %, nach 30 min 45 %. Bei weiterer Verlängerung der Fixierungszeit ging ihr prozentualer Anteil an der Gesamtfixierung jedoch immer weiter zurück. Die Radioaktivität im Arginin verlief umgekehrt zur Glutaminsäuremarkierung. Nach 5 min Einbauzeit betrug ihr Anteil nur 7 %. Mit zunehmender Fixierungszeit stieg er weiter an und erreichte nach 3 Stunden rund 29 %. Asparaginsäure erreichte ihre maximale Markierung (12 %) nach 2 Stunden, nach 3 Stunden war diese schon auf 3 % abgesunken. Die anderen Aminosäuren, vor allem Serin-Glycin und Threonin, zeigten weniger auffällige Veränderungen (vgl. Abb. 4b). Die organischen Säuren (Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure) waren nur schwach markiert; ihre pools waren meist schon nach

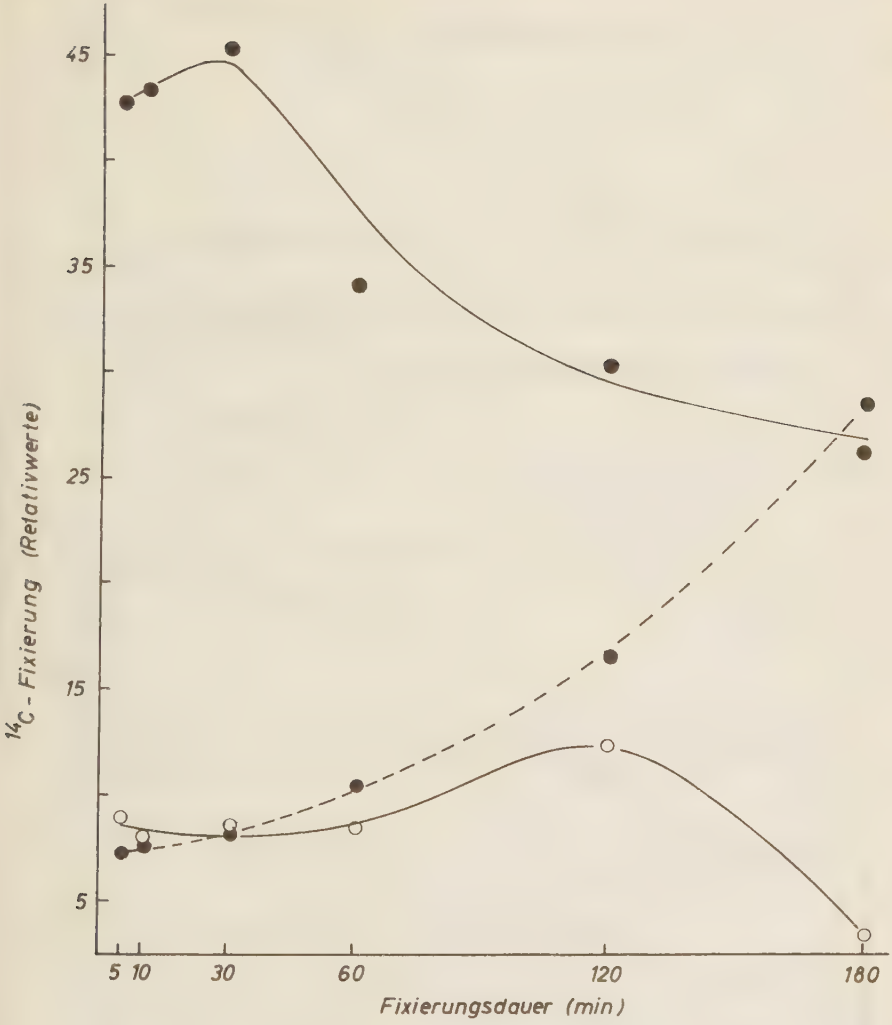


Abb. 4a: ^{14}C-Einbau in verschiedene Intermediärprodukte von Isaria in Abhängigkeit von der Fixierungsdauer (Lichteinbau, Einzelheiten vgl. im Text)

●——● Glutaminsäure

○——○ Asparaginsäure

●- - - -● Arginin

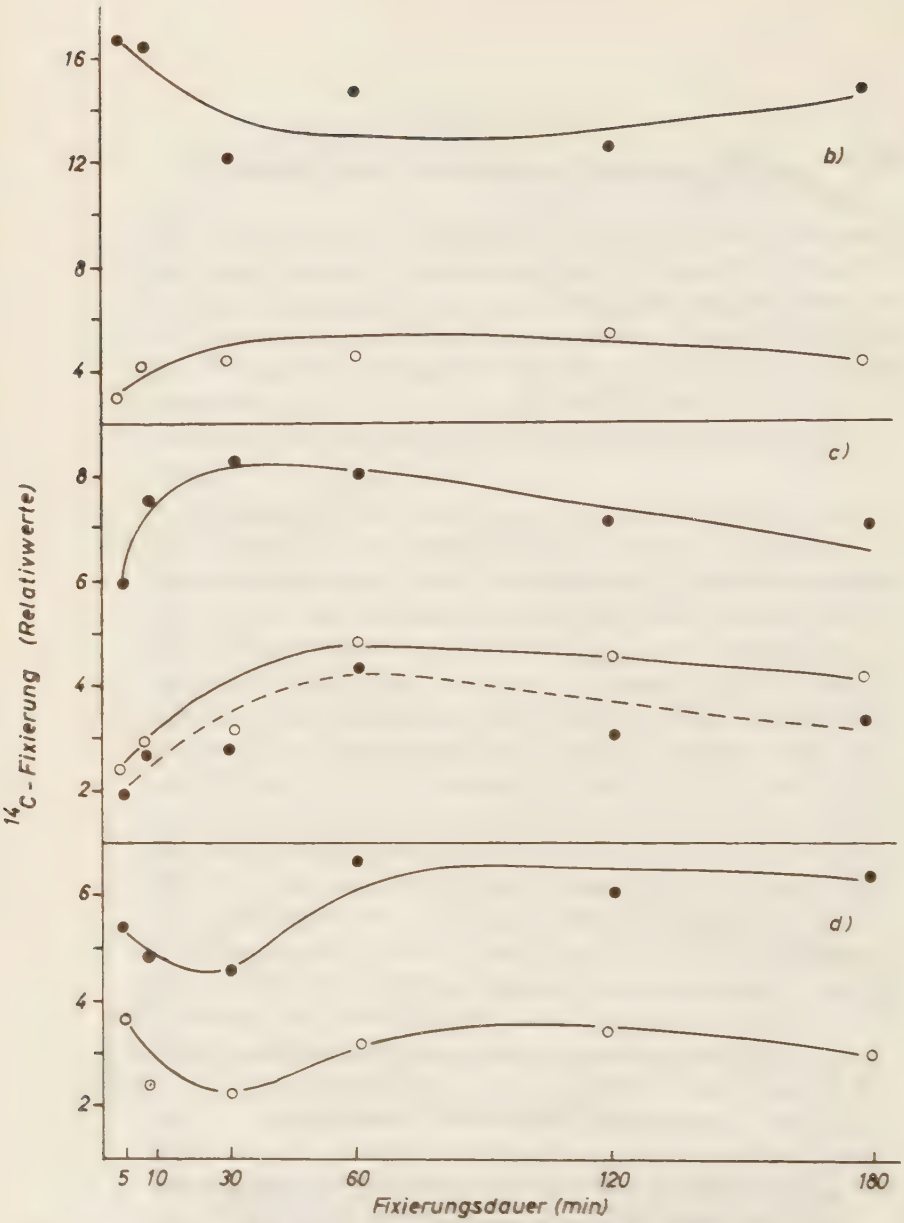


Abb. 4b; 4c; 4d: ^{14}C-Einbau in verschiedene Intermediärprodukte von Isaria in Abhängigkeit von der Fixierungsdauer (Lichteinbau, Einzelheiten vgl. im Text)

b) ●——● Serin-Glycin, ○——○ Threonin
c) ●——● Äpfelsäure, ○——○ Fumarsäure
●- - - - - ● Bernsteinsäure
d) ●——● Phosphoenolbrenztraubensäure,
○——○ Zuckerphosphate (Startfleck)

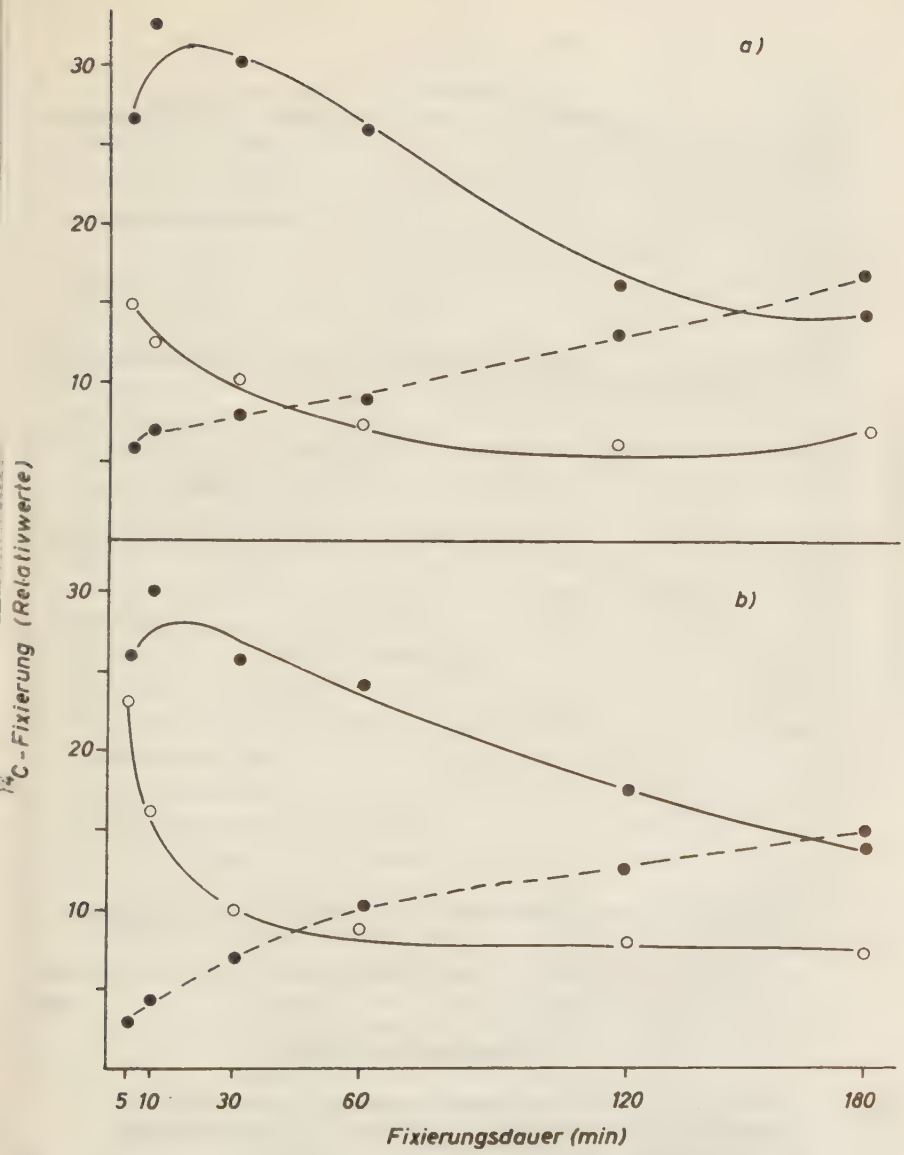


Abb. 5: ^{14}C-Einbau in verschiedene Intermediärprodukte von Neurospora in Abhängigkeit von der Fixierungsdauer (Lichteinbau, Einzelheiten vgl. im Text)
a) Normalstamm, b) Arginin-heterotrophe Mutante

●——● Glutaminsäure, ○——○ Asparaginsäure,
●----● Arginin (bei der Mutante Ornithin)

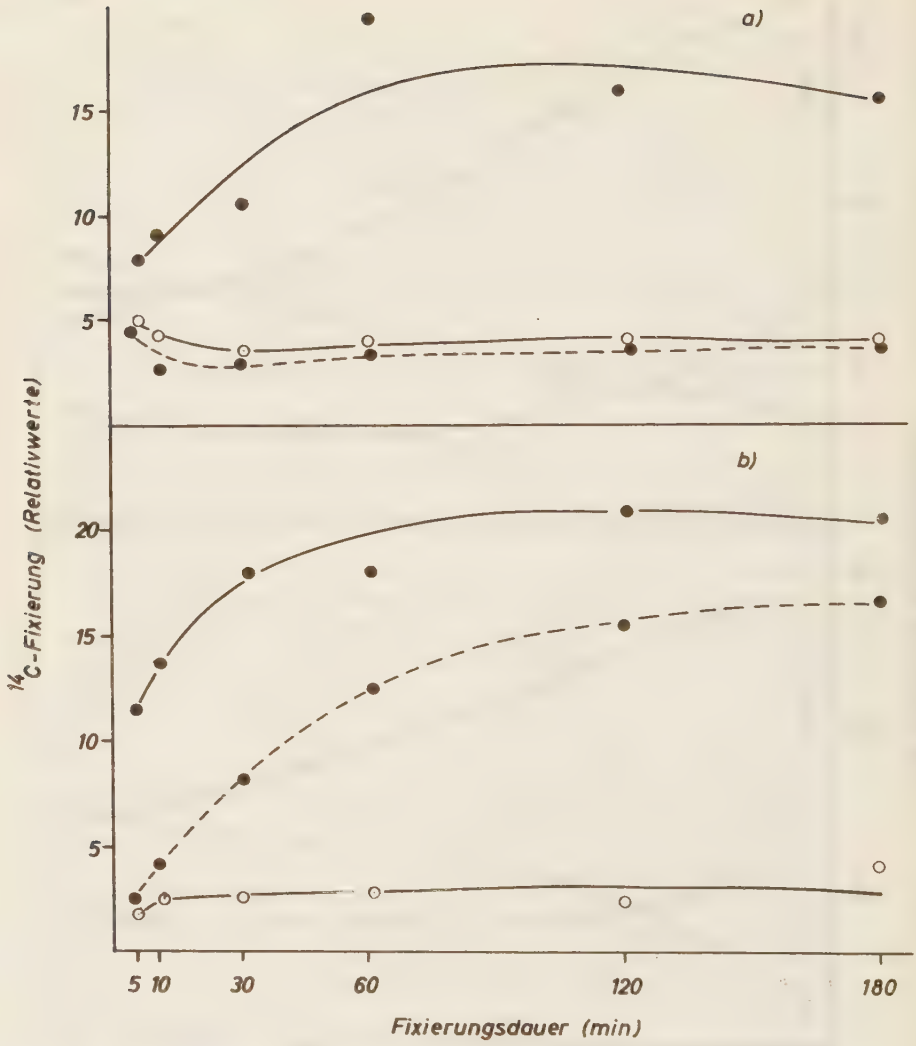


Abb. 6: ^{14}C-Einbau in verschiedene Intermediärprodukte von Neurospora in Abhängigkeit von der Fixierungsdauer (Lichteinbau, Einzelheiten vgl. im Text)
a) Normalstamm, b) Arginin-heterotrophe Mutante

●———● Äpfelsäure, ○———○ Fumarsäure,
●- - - -● Bernsteinsäure

Fixierungsdauer (min)	5	10	30	60	120	180
Brenztraubensäure	1,9	2,7	2,8	4,3	3,3	3,4
Fumarsäure	2,4	2,9	3,1	4,8	4,6	4,2
Äpfelsäure	5,9	7,5	8,2	8,0	7,4	7,0
Glutaminsäure	42,9	43,2	45,4	34,6	30,9	26,5
Asparaginsäure	9,1	8,1	8,7	8,4	12,5	3,1
Serin + Glycin	16,8	16,5	12,1	14,7	12,9	14,3
Threonin	3,0	4,2	4,4	4,5	5,2	4,1
Ornithin + Arginin	7,2	7,7	8,3	10,7	16,7	28,7
Phosphoenol-BTS	5,6	4,9	4,6	6,8	6,5	6,3
Zuckerphosphate	3,9	2,5	2,6	3,3	1,5	3,0

Tabelle 3: ^{14}C-Einbau in alkohollösliche Intermediärprodukte von Isaria in Abhängigkeit von der Fixierungsdauer. Die Fixierungen erfolgten im Licht. Die Proben für diese Versuche wurden in der logarithmischen Phase der Pilze entnommen. (Angaben in Prozent der Gesamtaktivität der jeweiligen Chromatogramme; Einzelheiten vgl. im Text).

Fixierungsdauer (min)	5	10	30	60	120	180
Brenztraubensäure	4,8	3,1	3,6	3,9	4,0	4,0
Fumarsäure	4,9	4,1	3,5	4,0	4,1	4,0
Äpfelsäure	7,8	8,9	10,4	19,0	16,0	15,4
Glutaminsäure	26,9	33,6	30,3	25,9	16,0	14,5
Asparaginsäure	14,9	12,8	9,6	7,2	6,7	7,1
Serin + Glycin	6,7	6,5	8,0	6,2	6,6	6,8
Tryptophan	7,2	9,2	14,1	9,7	11,2	8,3
Threonin	3,6	3,6	4,6	5,1	5,5	6,0
Ornithin + Arginin	5,9	6,9	8,0	9,0	12,8	16,8
Phosphoenol-BTS	7,5	5,7	4,2	4,5	6,8	6,2
Zuckerphosphate	8,3	5,6	4,6	4,3	10,1	10,3

Tabelle 4: ^{14}C-Einbau in alkohollösliche Intermediärprodukte von Neurospora (Normalstamm) in Abhängigkeit von der Fixierungsdauer. Die Fixierungen erfolgten im Licht. Die Proben für diese Versuche wurden in der logarithmischen Phase entnommen. (Angaben in Prozent der Gesamtaktivität der jeweiligen Chromatogramme; Einzelheiten vgl. im Text).

Fixierungsdauer (min)	5	10	30	60	120	180
Citronensäure	1,3	0,9	0,7	0,6	0,5	0,5
Brenztraubensäure	2,4	4,0	8,0	12,5	15,5	16,6
Fumarsäure	2,3	2,0	2,5	2,7	2,7	3,6
Äpfelsäure	11,5	13,4	18,2	18,1	20,7	20,6
Glutaminsäure	26,2	31,4	26,4	24,0	17,3	14,3
Asparaginsäure	23,7	16,2	10,2	9,0	8,0	7,4
Serin + Glycin	9,0	8,9	9,2	9,7	9,0	10,3
Threonin	7,0	6,6	8,5	6,6	5,5	5,0
Alanin	0,6	0,4	0,5	0,7	0,3	0,5
Ornithin	2,9	4,3	7,1	10,0	12,5	14,9
Phosphoenol-BTS	7,4	7,5	6,3	5,7	5,8	3,9
Zuckerphosphate	5,0	4,3	2,8	2,3	3,0	2,7

Tabelle 5: ^{14}C-Einbau in alkohollösliche Intermediärprodukte von Neurospora (Arginin-heterotrophe Mutante) in Abhängigkeit von der Fixierungsdauer. Die Fixierungen erfolgen im Licht. Die Proben für diese Versuche wurden in der logarithmischen Phase der Pilze entnommen. (Angaben in Prozent der Gesamtaktivität der jeweiligen Chromatogramme; Einzelheiten vgl. im Text).

kurzer Zeit gesättigt (vgl. Abb. 4c). Auch Phosphoenolbrenztraubensäure und die am Startfleck verbleibenden Zuckerphosphate zeigten Veränderungen in ihrer Markierung nach verschiedenen Fixierungszeiten (Abb. 4d). Wie kaum anders zu erwarten, ist die Beteiligung von Zuckerphosphaten an der C-Fixierung durch Pilzmyzelien sehr gering.

In den beiden Stämmen von Neurospora verhielten sich die Aminosäuren Glutaminsäure, Asparaginsäure, Arginin und Ornithin fast gleich (Abb. 5a, b). Das Maximum der Asparaginsäuremarkierung lag in beiden Stämmen bei 5 min Fixierung; jedoch betrug der Anteil der Asparaginsäure an der Gesamtfixierung bei der Mutante 23 %, beim Normalstamm nur 15 %. Äpfelsäure und Fumarsäure zeigten bei beiden Stämmen einen in Abhängigkeit von der Fixierungsdauer praktisch identischen Verlauf (Abb. 6a, b). Dagegen war Bernsteinsäure im Normalstamm nur schwach markiert (4 %); der pool war nach kurzer Zeit gesättigt. Bei der Mutante dagegen stieg die Markierung der Bernsteinsäure auf 15 % an; der pool war hier erst nach 120 min gesättigt (Abb. 6b).

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte für die weiteren Versuche eine geeignete Fixierungszeit ausgewählt werden. Es erschien günstig, Zeiten zwischen 30 und 120 min auszuwählen.

^{14}C-Einbau in den verschiedenen Phasen des Wachstums

Die weiteren Versuche sollten Aufschluß darüber geben, wie das Entwicklungsstadium der Pilze den ^{14}C-Einbau beeinflußt. Hierzu wurden die Fixierungsrate und die relative Markierung der verschiedenen Intermediärprodukte im Verlauf des Pilzwachstums untersucht. Von jedem Stamm wurde

täglich eine Probe entnommen und ein Fixierungsexperiment - wie im methodischen Teil beschrieben - durchgeführt. Bei Isaria war die Gesamtfixierung in den ersten beiden Tagen (Lag-Phase) sehr niedrig; sie stieg dann bis zum 5. Tag (Ende der logarithmischen Phase) an. Danach blieb sie fast konstant. Bezieht man aber die Fixierungsrate auf das Trockengewicht, dann verläuft die Kurve fast umgekehrt (Abb. 7). Bei einer Fixierungszeit von 120 min war auch die unlösliche Fraktion zu berücksichtigen, wenn sie auch nur 6 - 13 % der Gesamtfixierung betrug. Wie erwartet, lag das Maximum bei der unlöslichen Fraktion am 4. Tag, wo die Pilze rasch wachsen (logarithmische Phase). Dagegen hatte die lösliche Fraktion an diesem Tag ihr Minimum (86 %) (Abb. 8).

Die Neurospora-Mutante zeigte das Maximum ihrer Gesamtfixierung nach dem 3. Tag des Wachstumsverlaufs (Ende der logarithmischen Phase); danach fällt die Kurve wieder ab. Bezieht man aber die Gesamtfixierung auf das Trockengewicht, so verläuft die Kurve ungefähr wie bei Isaria (Abb. 9). Die unlösliche Fraktion enthielt bei Neurospora mehr Radioaktivität als bei Isaria. Ihr Maximum (25 %) wurde in der logarithmischen Phase erreicht (Abb. 10).

Da nur relativ frühe Intermediärprodukte der ^{14}C-Fixierung studiert werden sollten, wurden allein die löslichen Fraktionen der drei Pilze im Verlauf ihres Wachstums untersucht. Bei Isaria waren Glutamin- und Asparaginsäure während der ersten drei Tage des Wachstums relativ stark markiert (Glutaminsäure 30 %, Asparaginsäure 12 %); nach dem Beginn der logarithmischen Phase am 3. Tag wurde weniger ^{14}C in die beiden Aminosäuren eingebaut. Die anderen Aminosäuren (Serin + Glycin und Arginin) blieben bei Isaria im Laufe des Wachstums mengenmäßig fast unverändert. Die organischen Säuren, besonders Äpfelsäure

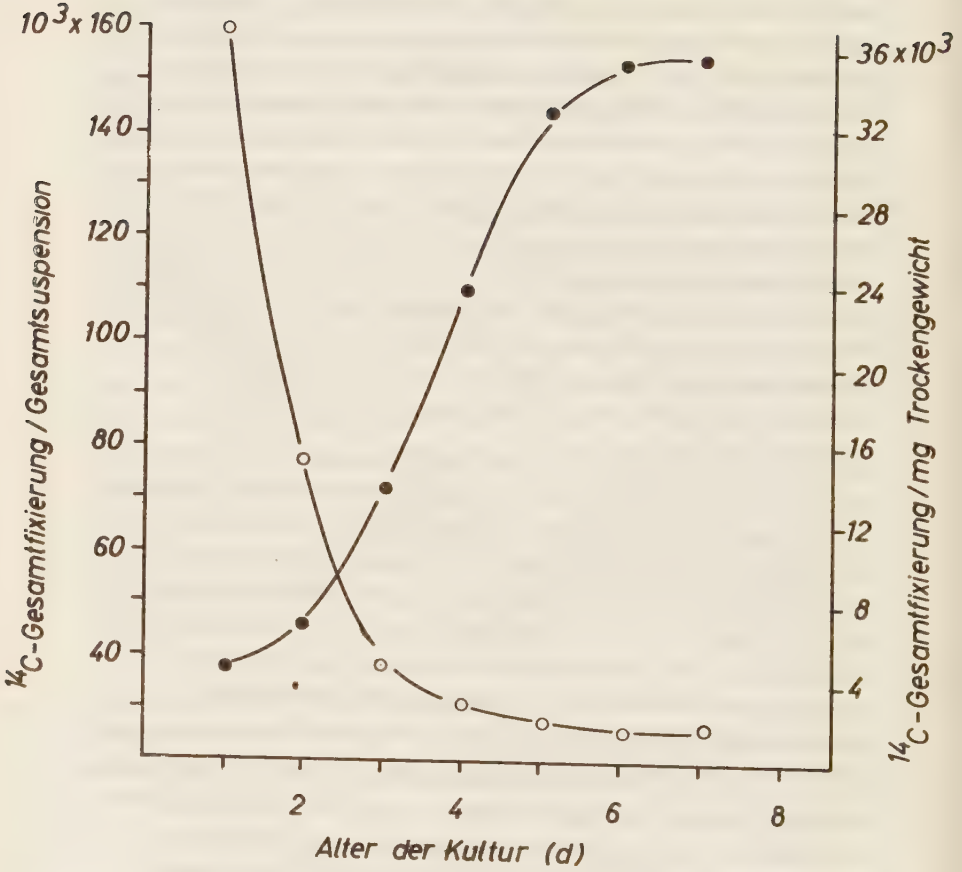


Abb. 7: ^{14}C-Gesamtfixierung in verschiedenen Stadien einer Isaria-Kultur (Versuchsbedingungen vgl. im Text), bezogen auf

●——● Gesamtsuspension (Imp/min/15 ml Pilzsuspension)

⊙——⊙ Trockengewicht (Imp/min/mg Trockengewicht)

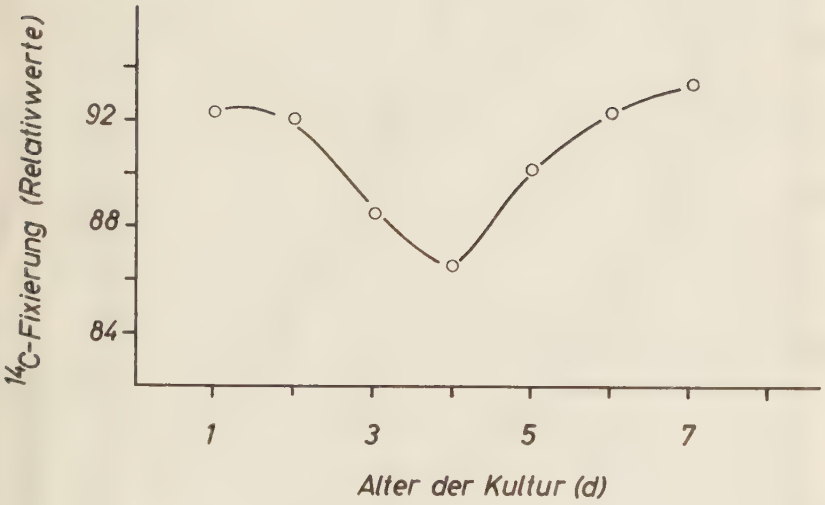


Abb. 8: ^{14}C-Einbau in alkohollösliche Intermediärprodukte in verschiedenen Stadien einer Isaria-Kultur (Versuchsbedingungen vgl. im Text)

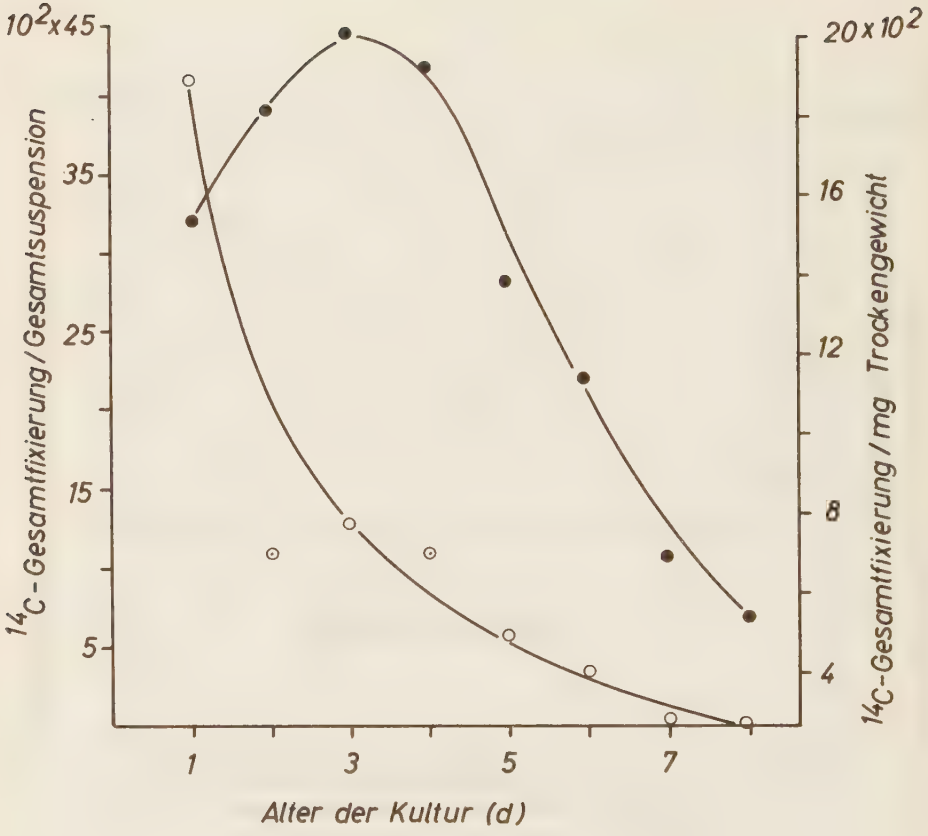


Abb. 9: ^{14}C-Gesamtfixierung in verschiedenen Stadien einer Neurospora-Kultur (Arginin-heterotrophe Mutante, Versuchsbedingungen vgl. im Text), bezogen auf

●——● Gesamtsuspension (Imp/min/ml Pilzsuspension)

⊙——⊙ Trockengewicht (Imp/min/mg Trockengewicht)

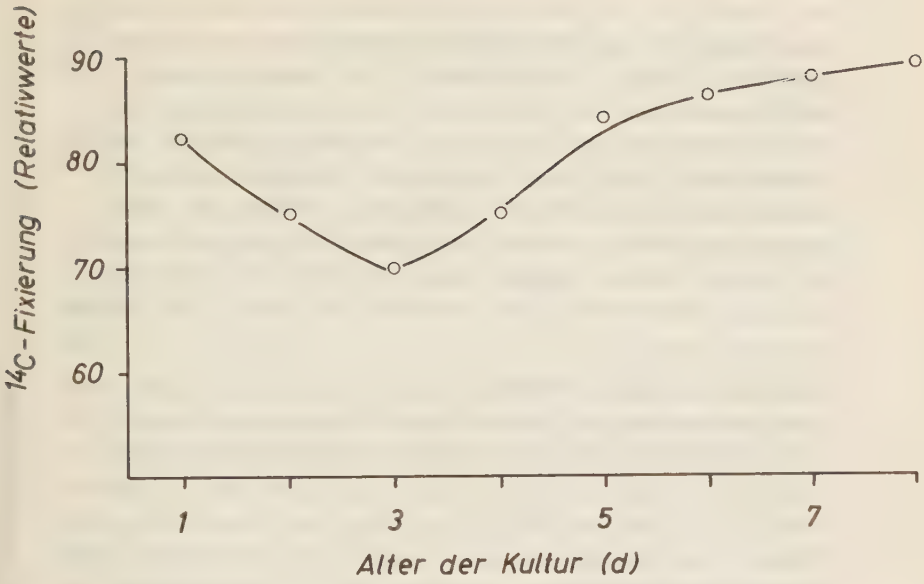


Abb. 10: ^{14}C-Einbau in alkohollösliche Intermediärprodukte in verschiedenen Stadien einer Neurospora-Kultur (Arginin-heterotroph-Mutante, Versuchsbedingungen vgl. im Text)

und Fumarsäure, zeigten Veränderungen im Laufe des Wachstums (Abb. 11). In der Lag-Phase erreichten sie Minima (Äpfelsäure 12,5 %, Fumarsäure 13 %); danach stiegen ihre Markierungsraten an (Äpfelsäure 27 %, Fumarsäure 21 %). Bernsteinsäure blieb bei Isaria über die einzelnen Wachstumsstadien hinweg mehr oder weniger konstant markiert. Einige andere Aminosäuren, organische Säuren und unbekannte Substanzen tauchten regelmäßig im Chromatogramm auf, waren aber so schwach markiert, daß sie nicht quantitativ ausgewertet werden konnten (vgl. Tab. 6 und Chromatogramm Ia,b).

Auch bei Neurospora ergaben sich Unterschiede in der relativen Markierung der verschiedenen Intermediärprodukte im Laufe des Wachstums. Beim normalen Stamm ist die Glutaminsäure am 1. Tag (Lag-Phase) stark markiert (30 %), danach nimmt ihr Anteil bis zum 4. Tag (Ende der logarithmischen Phase) ab und bleibt dann mehr oder weniger konstant. Die Asparaginsäuremarkierung schwankt um 12 % und die Fraktion Arginin + Ornithin um 4 %. Bei der Neurospora-Mutante sieht der Verlauf der Aminosäuremarkierung anders aus (Abb. 12). Das Maximum der Glutaminsäuremarkierung (22 %) erscheint am 2. Tag, fällt bis zum Ende der logarithmischen Phase ab und bleibt während der stationären Phase fast konstant. Im Gegensatz zum normalen Stamm zeigte die Asparaginsäure einen Abfall von 23 % am 1. Tag bis auf ca. 6 % am 8. Tag. Ornithin stieg von 1,5 % am 1. Tag auf 8,5 % am 8. Tag an. Bei beiden Neurospora-Stämmen wurden auch Serin + Glycin, Alanin, Tryptophan und Threonin ausgewertet.

Die organischen Säuren (Äpfelsäure, Bernsteinsäure und Fumarsäure) zeigten im Verlauf des Wachstums beider Neurospora-Stämme ebenfalls Unterschiede in ihren Markierungsraten (Abb. 13). (Vgl. Tab.7,8 und Chromatogramme IIa,b).

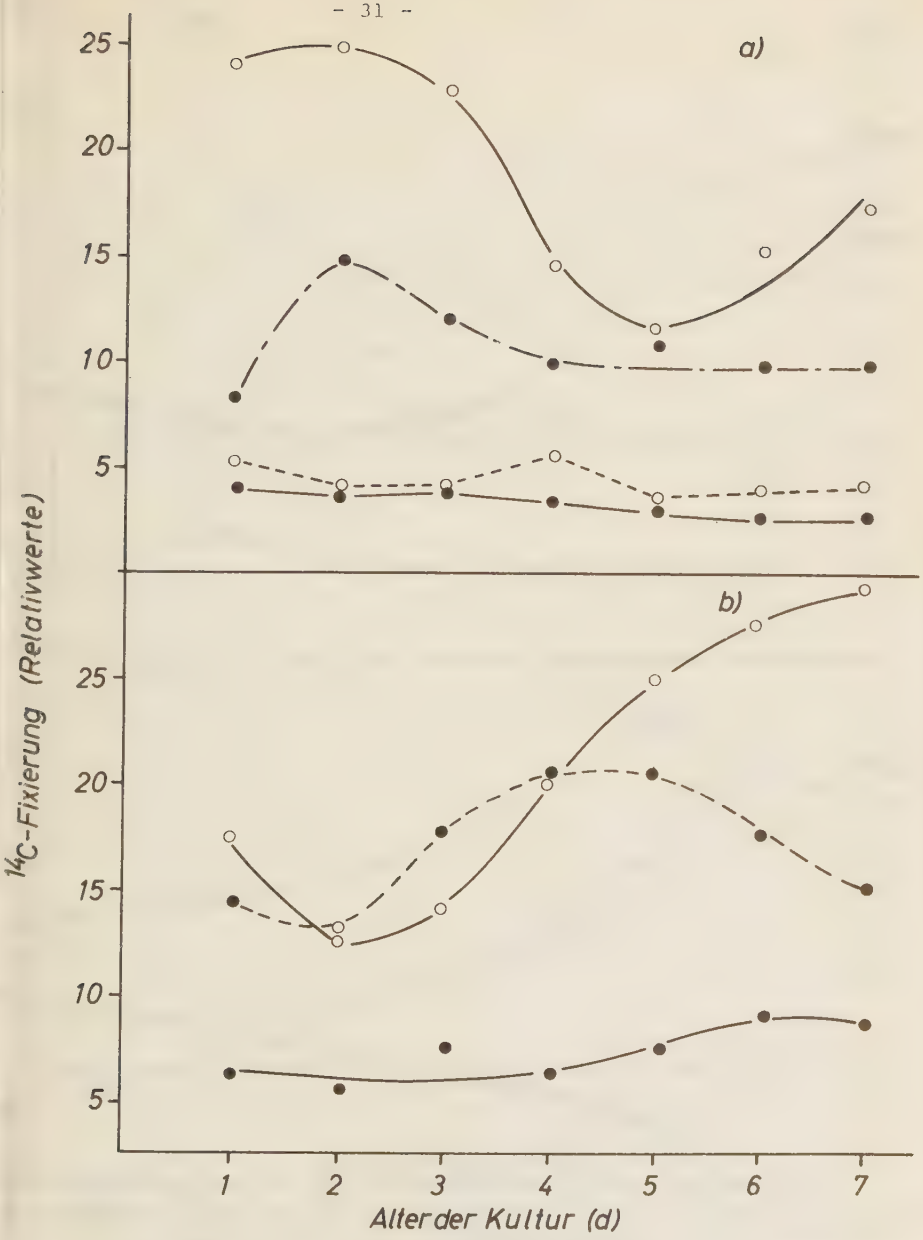


Abb. 11: ^{14}C-Einbau in einige alkohollösliche Intermediärprodukte von Isaria in Abhängigkeit vom Pilzalter (Einzelheiten vgl. im Text).

a) Aminosäure: ○——○ Glutaminsäure
●– – –○ Asparaginsäure ⊙- - -⊙ Arginin
●——● Serin + Glycin

b) Organische Säure: ○——○ Äpfelsäure
●——● Bernsteinsäure
●- - -● Fumarsäure

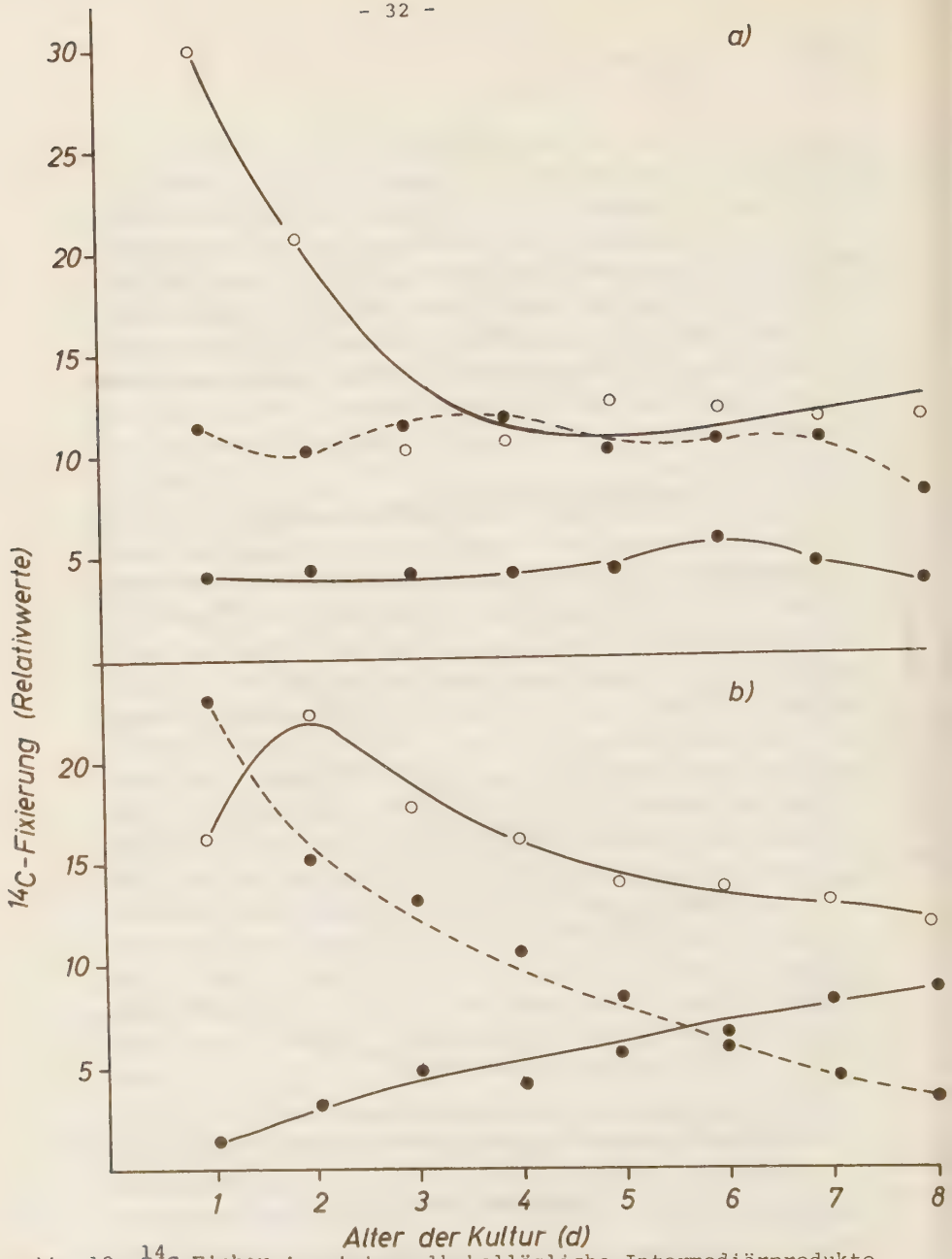


Abb. 12: ^{14}C-Einbau in einige alkohollösliche Intermediärprodukte von Neurospora in Abhängigkeit vom Pilzalter (Einzelheiten vgl. im Text)

a) Normalstamm: ○——○ Glutaminsäure
●- - - -● Asparaginsäure
●——● Arginin

b) Arginin-heterotrophe Mutante: ○——○ Glutaminsäure
●- - - - -● Asparaginsäure
●——● Ornithin

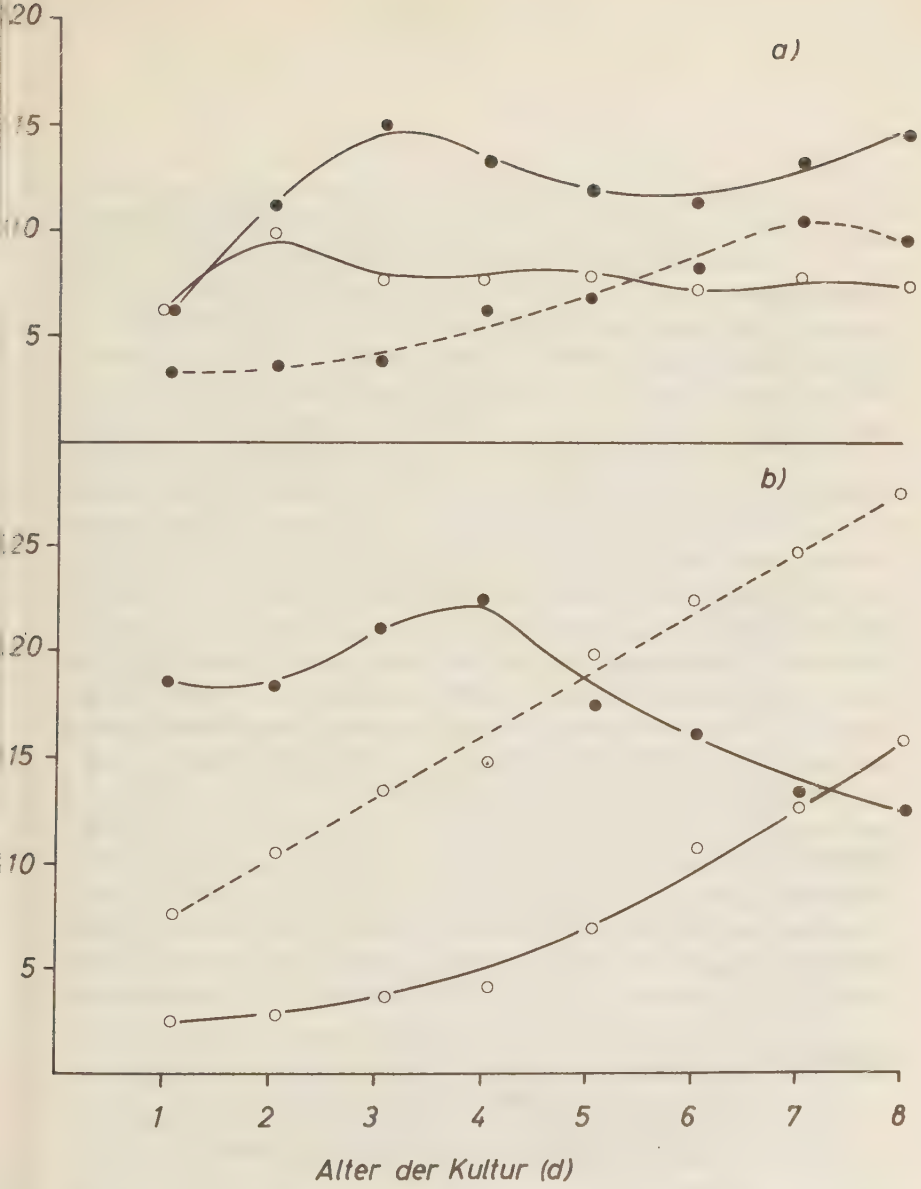


Abb. 13: ^{14}C-Einbau in einige alkohollösliche Intermediärprodukte von Neurospora in Abhängigkeit vom Pilzalter (Einzelheiten vgl. im Text).

a) Normalstamm: ○——○ Äpfelsäure ●- - -● Fumarsäure
●——● Bernsteinsäure

b) Arginin-heterotrophe Mutante: ○- - - -○ Äpfelsäure
○——○ Fumarsäure
●——● Bernsteinsäure

Pilzalter (Tage)	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Citronensäure	2,7	2,1	2,5	1,9	1,0	0,0	0,4
Brenztrauben-säure	6,6	5,6	7,8	6,5	7,6	8,9	8,5
Fumarsäure	14,7	13,6	17,5	20,0	20,6	17,4	15,9
Äpfelsäure	17,2	12,9	14,7	19,9	25,3	27,6	29,1
Glutaminsäure	28,2	29,5	25,8	14,8	12,9	15,7	17,2
Asparaginsäure	8,6	15,1	12,0	10,5	11,3	10,0	10,2
Serin + Glycin	4,2	4,2	4,5	4,2	3,0	2,7	2,8
Threonin	1,4	1,3	1,0	1,3	1,1	1,6	1,4
Ornithin + Arginin	5,6	5,3	4,3	5,5	3,5	3,9	4,1
Phosphoenol-BTS	4,5	5,1	4,8	9,8	9,7	9,4	8,5
Zuckerphosphate	4,2	4,3	4,6	8,9	2,8	2,8	1,2

Tabelle 6: ^{14}C-Einbau in alkohollösliche Intermediärprodukte von Isaria in Abhängigkeit vom Pilzalter. Die Fixierung erfolgt im Licht; sie dauerte zwei Stunden. (Angaben in Prozent der Gesamtaktivität der jeweiligen Chromatogramme; Einzelheiten vgl. im Text).

Pilzalter (Tage)	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Brenztraubensäure	6,6	11,9	15,0	13,8	12,8	12,0	13,4	14,8
Fumarsäure	3,7	3,9	3,9	6,5	7,1	8,2	10,7	9,7
Äpfelsäure	6,8	10,1	8,0	7,8	8,0	7,5	8,0	9,1
Glutaminsäure	30,0	20,9	10,2	11,0	12,6	12,0	11,7	11,9
Asparaginsäure	11,5	10,1	11,8	11,9	10,1	10,5	10,7	7,7
Serin + Glycin	10,7	9,1	9,7	10,1	10,1	10,5	9,3	8,8
Tryptophan	8,4	12,3	10,1	8,2	7,3	7,5	7,1	7,3
Threonin	7,5	6,6	9,1	10,5	9,9	8,0	7,7	9,5
Ornithin + Arginin	4,2	4,3	4,0	4,2	4,6	5,6	4,2	3,8
Phosphoenol-BTS	3,2	3,6	7,9	6,5	6,0	7,0	6,0	7,7
Zuckerphosphate	7,5	7,7	10,0	10,4	10,0	10,0	12,0	11,0

Tabelle 7: ^{14}C-Einbau in alkohollösliche Intermediärprodukte von Neurospora (Normalstamm) in Abhängigkeit vom Pilzalter. Die Fixierung erfolgte im Licht; sie dauerte zwei Stunden. (Angaben in Prozent der Gesamtaktivität der jeweiligen Chromatogramme; (Einzelheiten vgl. im Text)

Pilzalter (Tage)	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Brenztraubensäure	18,5	18,4	21,7	22,2	17,3	16,2	13,9	12,8
Fumarsäure	2,3	2,8	3,0	3,9	7,1	10,9	12,7	16,1
Äpfelsäure	7,8	10,5	13,3	14,7	20,0	22,5	24,8	27,2
Glutaminsäure	16,4	22,3	17,8	16,0	14,1	13,9	13,0	12,0
Asparaginsäure	23,0	15,2	13,4	10,6	8,2	6,1	4,6	3,1
Serin + Glycin	5,5	5,5	5,0	5,2	5,2	5,3	5,3	4,9
Threonin	17,0	10,7	8,2	10,3	9,7	8,1	8,3	6,9
Alanin	3,1	2,9	3,0	3,0	3,7	3,3	5,0	3,7
Ornithin	1,5	3,2	4,7	4,1	6,0	6,5	8,2	8,4
Phosphoenol-BTS	2,8	5,0	5,8	5,2	4,0	4,1	3,1	2,6
Zuckerphosphate	2,0	3,5	4,0	4,5	4,1	3,3	2,2	2,2

Tabelle 8: ^{14}C-Einbau in alkohollösliche Intermediärprodukte von Neurospora (Arginin-heterotrophe Mutante) in Abhängigkeit vom Pilzalter. Die Fixierung erfolgte im Licht; sie dauerte zwei Stunden. (Angaben in Prozent der Gesamtaktivität der jeweiligen Chromatogramme; Einzelheiten vgl. im Text).

Lichtabhängigkeit der $^{14}CO_2$-Fixierung

Nachdem sich Unterschiede in der Markierung der verschiedenen Intermediärprodukte zwischen CO_2-Fixierung im Dunkeln und im Weißlicht ergeben hatten, war es notwendig, den Einfluß der Lichtfarbe zu untersuchen und mit den Ergebnissen der Dunkel- und Weißlicht-Fixierung zu vergleichen. Hierzu wurde Rot- und Blaulicht verwendet. Um einen möglichen Einfluß des Entwicklungsalters der Pilze als Fehlerquelle auszuschalten, wurden alle Experimente einmal in der logarithmischen Phase und zum andern während der stationären Phase des Wachstumsverlaufs durchgeführt.

Bei Isaria sind die Intermediärprodukte bei den verschiedenen $^{14}CO_2$-Fixierungsexperimenten (Dunkelheit, Weißlicht, Rotlicht, Blaulicht) unterschiedlich markiert; dies gilt für beide Entwicklungsstadien der Pilze (Tabelle 9 und Chromatogramm IIIa,b). Besonders starke Unterschiede zeigten Glutaminsäure und Asparaginsäure. Beide waren im Rotlicht schwächer markiert als im Blaulicht. Auch im Dunkeln und im Weißlicht sind die beiden Aminosäuren stark markiert. Die Fraktion Arginin + Ornithin erscheint nach der Fixierung im Rotlicht - besonders während der stationären Phase - stark markiert. Die anderen Aminosäuren (Alanin, Threonin und die Fraktion Serin + Glycin) zeigten bei den verschiedenen Fixierungsexperimenten keine signifikanten Unterschiede.

Äpfelsäure ist nach der Fixierung im Blaulicht während der logarithmischen Phase schwach, in den anderen Fällen jedoch stark markiert. Während der stationären Phase wird die Äpfelsäure im Rotlicht im Vergleich zu den anderen Bedingungen sehr stark markiert. Fumarsäure und Bernsteinsäure hatten bei der Fixierung im Rotlicht in beiden Wachstumsphasen stärkere Markierung gezeigt. Brenztraubensäure und die Substanzen am Startfleck (Phosphatester) sind nach

Pilzalter	3. Tag (logarithmische Phase)				6. Tag (Ende der logarithmischen Phase)			
	D	L	R	B	D	L	R	B
Citronensäure	-	-	-	-	2,9	2,9	1,6	1,6
Brenztraubensäure	1,0	1,3	1,5	1,1	0,5	0,3	5,1	0,9
Fumarsäure	1,0	0,5	4,2	4,1	2,3	2,6	7,5	2,3
Äpfelsäure	14,7	14,9	15,1	9,9	8,3	6,6	19,4	6,3
Glutaminsäure	52,9	49,3	40,4	49,9	51,1	55,1	41,0	60,2
Asparaginsäure	11,3	12,1	7,6	14,0	8,3	10,0	2,5	5,8
Serin + Glycin	4,8	4,0	4,3	4,9	10,8	10,2	5,0	7,0
Alanin	0,4	1,3	2,1	1,1	3,9	2,7	3,1	3,8
Threonin	1,3	2,3	2,4	2,7	0,0	0,3	1,1	0,8
Ornithin + Arginin	5,7	7,2	8,1	4,2	2,8	2,5	5,3	3,8
Phosphoenol-BTS	5,1	4,3	5,9	4,0	6,1	6,8	5,5	2,3
Zuckerphosphate	1,8	2,0	2,4	4,2	2,4	2,5	2,4	4,2

Tabelle 9: ^{14}C-Einbau in alkohollösliche Intermediärprodukte von Isaria. Die Fixierung erfolgte im Dunkeln, im Weiß-, im Rot- und im Blaulicht; sie dauerte 30 Minuten. Die Versuche wurden in zwei verschiedenen Wachstumsphasen der Pilze durchgeführt. (Angaben in Prozent der Gesamtaktivität der jeweiligen Chromatogramme; Einzelheiten vgl. im Text).

den verschiedenen Fixierungen ebenfalls unterschiedlich stark markiert.

Auch bei Neurospora sind die Intermediärprodukte nach den verschiedenen $^{14}CO_2$-Fixierungen unterschiedlich markiert (Tab. 10,11 und Chromatogramme IVa,b). Beim normalen Stamm haben Glutaminsäure, Asparaginsäure und die Fraktion Arginin + Ornithin nach der Fixierung im Blaulicht sowie im Weißlicht relativ starke Markierung gezeigt; sie lagen aber im Dunkeln und im Rotlicht recht niedrig. Diese Unterschiede waren während der logarithmischen Phase besonders deutlich zu erkennen; während der stationären Phase sind sie nicht mehr signifikant.

Im Gegensatz zu den erwähnten Aminosäuren zeigte die Fraktion Serin + Glycin bei Dunkelfixierung und im Rotlicht stärkere Markierung. Tryptophan war in beiden Wachstumsphasen in allen Fixierungsexperimenten stärker markiert. Auch die Intermediärprodukte Alanin, Threonin, Citronensäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Brenztraubensäure und die Substanzen am Startfleck ergaben gewisse Unterschiede in ihren relativen Markierungen.

Die Markierungsmuster der Neurospora-Mutante sind bei den verschiedenen Experimenten ganz verschieden von denen des Normalstamms (vgl. Tab.10,11). Glutaminsäure erscheint nach der CO_2-Fixierung im Dunkeln während der logarithmischen Phase stärker, während der stationären Phase jedoch weniger stark markiert. Asparaginsäure ist nach der Fixierung im Blaulicht stärker markiert; in anderen Experimenten zeigte sie aber keine signifikanten Unterschiede zum Normalstamm. Im Gegensatz zum Normalstamm sind die Fraktion Serin + Glycin und das Tryptophan schwach, Threonin - besonders nach der Fixierung im Rotlicht - jedoch stark markiert.

Pilzalter	2. Tag (logarithmische Phase)				5. Tag Ende der logarithmischen Phase			
	D	L	R	B	D	L	R	B
Citronensäure	2,0	1,5	1,4	0,0	0,8	0,7	1,4	1,0
Brenztraubensäure	1,3	1,6	1,6	1,7	4,1	1,8	2,7	1,8
Fumarsäure	0,2	0,9	0,8	0,8	2,2	1,2	0,6	3,1
Äpfelsäure	3,0	2,4	2,5	6,7	13,8	11,2	15,9	11,0
Glutaminsäure	27,1	40,3	27,4	39,1	20,0	28,7	21,4	20,9
Asparaginsäure	4,0	6,2	3,8	7,7	11,1	12,7	9,1	15,4
Serin + Glycin	29,7	6,3	31,4	18,7	22,4	20,0	22,3	13,5
Alanin	4,4	4,8	3,8	3,4	2,5	3,8	3,8	1,8
Threonin	4,23	2,1	2,8	1,6	4,8	4,1	4,5	3,8
Ornithin + Arginin	6,3	11,2	5,4	9,1	3,1	2,9	2,9	3,1
Tryptophan	14,2	18,8	17,4	10,1	10,8	9,8	13,0	9,2
Phosphoenol-BTS	1,8	2,2	1,1	1,2	4,1	2,5	2,2	4,2
Zuckerphosphate	1,7	1,7	0,9	0,0	0,9	0,7	1,8	0,8

Tabelle 10: ^{14}C-Einbau in alkohollösliche Intermediärprodukte von Neurospora (Normalstamm). Die Fixierung erfolgte im Dunkeln, im Weiß-, im Rot- und im Blaulicht; sie dauerte 30 Minuten. Die Versuche wurden in zwei verschiedenen Wachstumsphasen der Pilze durchgeführt. (Angaben in Prozent der Gesamtaktivität der jeweiligen Chromatogramme. Einzelheiten vgl. im Text).

Pilzalter	2. Tag (logarithmische Phase)				5. Tag (Ende der logarithmischen Phase)			
	D	L	R	B	D	L	R	B
Citronensäure	1,6	0,9	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Brenztraubensäure	6,7	13,3	9,1	5,2	35,3	15,4	27,1	25,8
Fumarsäure	0,3	0,3	0,3	0,6	5,5	6,7	6,1	5,1
Äpfelsäure	9,0	23,0	20,1	11,5	25,6	17,8	30,4	31,4
Glutaminsäure	38,2	23,3	23,7	22,8	10,2	20,0	15,1	14,1
Asparaginsäure	7,7	8,0	6,5	11,4	10,2	11,5	10,3	9,4
Serin + Glycin	13,1	9,1	8,3	12,4	2,5	5,8	1,6	1,9
Alanin	8,4	0,0	2,8	3,9	0,0	0,0	0,0	0,5
Threonin	12,2	8,9	22,5	14,0	1,5	6,1	1,3	1,0
Ornithin	3,9	4,3	3,2	2,8	7,3	6,9	6,6	7,5
Phosphoenol-BTS	3,9	7,4	4,1	8,3	1,3	6,9	3,3	2,9
Zuckerphosphate	2,5	7,4	1,6	4,2	0,7	2,1	0,3	0,3

Tabelle 11: ^{14}C-Einbau in alkohollösliche Intermediärprodukte der Neurospora (Arginin-heterotrophe Mutante). Die Fixierung erfolgte im Dunkeln, im Weiß-, im Rot- und im Blaulicht; sie dauerte 30 Minuten. Die Versuche wurden in zwei verschiedenen Wachstumsphasen der Pilze durchgeführt. (Angaben in Prozent der Gesamtaktivität der jeweiligen Chromatogramme. Einzelheiten vgl. im Text).

Citronensäure und Fumarsäure zeigten bei der Mutante ungefähr dieselben Markierungsraten wie beim Normalstamm. Äpfelsäure ist - besonders nach der Fixierung im Weißlicht und Rotlicht während der logarithmischen Phase - stark markiert. Merkwürdigerweise erscheint aber die Bernsteinsäure nach der Fixierung im Dunkeln während der stationären Phase bei der Mutante sehr stark markiert. Auch Brenztraubensäure und die Substanzen am Startfleck zeigten Unterschiede bei den verschiedenen Fixierungsexperimenten.

IV. DISKUSSION

Lichteinflüsse auf Wachstum und Entwicklung sind nicht nur für autotrophe Organismen sondern auch für verschiedene Heterotrophe bekannt. Weit verbreitet ist auch bei Pilzen eine phototropische Reaktion (TABER und VINING 1959), die ihr Empfindlichkeitsmaximum normalerweise im kurzwelligen Spektralbereich hat, bei einigen Arten jedoch - so auch bei der Gattung Isaria - ein weiteres Maximum im Rot (600 - 700 nm) zeigt. Über die verantwortlichen Sensibilisatoren ist wenig bekannt. Mehrfach ist diskutiert worden, daß bei Pilzen Carotinoide (BÜNNING 1937, 1938b) und Flavoproteide (GALSTON und BAKER 1949) in Betracht kommen können, doch fehlt jede Vorstellung, durch welche Pigmente die langwellige Strahlung absorbiert werden kann.

Daß Pilze Licht zu ihrer normalen Entwicklung benötigen, ist mehrfach gezeigt worden. Nach GOLDSTEIN (1963) wird z.B. Thraustochytrium in der logarithmischen Phase durch Licht gefördert. Andererseits kann Dauerbelichtung die Sporenbildung von Peronospora hemmen (CRUICKSHANK 1963). Die eigenen Untersuchungen liessen erkennen, daß bei Isaria im Dunkeln die Entwicklung der Synnemata verspätet

eintritt, während andererseits im Dauerlicht die Hyphen der Synnemata nicht kompakt ausgebildet werden. Somit scheinen - zumindest einige - Pilze einen bestimmten Licht-Dunkel-Wechsel nötig zu haben. Isaria wächst in einem 8:$\overline{16}$-Stunden-Wechsel befriedigend. Auch für andere Pilze ist der günstige Einfluß periodischer Licht-Dunkel-Wechsel gezeigt worden, so für Phytophthora synnanomi (HARNISH 1965, MANNING und CROSSAN 1966) und für Trichothecium roseum (SAGROMSKY 1959a).

Über die CO_2-Fixierung durch heterotrophe Organismen liegen weit weniger Erfahrungen vor als über den Kohlenstoffeinbau in autotrophe Zellen. Zwar hat sich zeigen lassen, daß viele Pilze für ihre normale Entwicklung CO_2 benötigen (RIPPEL und BORTELS 1927, ROCKWELL und HIGHBERGER 1927, vgl. auch YANAGITA 1957, WOOD und UTTER 1965, TABAK und COOKE 1968) doch scheinen Heterotrophe das CO_2 sehr viel langsamer einzubauen als etwa Algenzellen. Um hohe Fixierungsraten messen zu können, müssen die Einbauzeiten daher wesentlich verlängert werden. Die von KANAI und Mitarbeitern (1960) und von TSAY und Mitarbeitern (1965) verwendete Technik, den suspendierten Myzelien $NaH^{14}CO_3$ in gepufferter Lösung anzubieten, hat sich weit besser bewährt als die Applikation des $^{14}CO_2$ in der Gasphase.

Die stärkere Markierung eines bestimmten Intermediärproduktes kann sowohl auf dessen bevorzugter Bildung als auch auf dessen langsamerer Transformation beruhen. Sicherlich dienen die frühesten Intermediärprodukte lediglich als Durchgangsstufen. Nach verhältnismäßig kurzer Fixierungszeit sind bei Isaria und Neurospora die beiden Aminodicarbonsäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure besonders stark markiert. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen, die STOPPANI und Mitarbeiter (1958) an Hefesuspensionen erzielten. Auch in den photosynthetisch

tätigen Bakterien sind diese beiden Intermediärprodukte nach kurzen Einbauzeiten bevorzugt markiert (DOMAN 1968). Insofern liegen bei den untersuchten Pilzen andere Verhältnisse vor als bei Chlorophyceen, bei denen insbesondere die Glutaminsäure selbst nach 2 Minuten langer Einbauzeit nicht gefunden wurde (AHMED 1968).

Auch Serin und Glycin werden rasch markiert. Dagegen lagerte das α-Alanin nur wenig ^{14}C ein. Das weist darauf hin, daß diese beiden Aminosäuren nicht aus der Brenztraubensäure entstehen, sondern über eine frühe C_4-Komponente gebildet werden. Dagegen sind die beiden basischen Aminosäuren Ornithin und Arginin erst nach längeren Fixierungsraten radioaktiv. Das hängt zweifellos damit zusammen, daß beide über einen längeren Syntheseweg (α-Ketoglutarsäure ——→ Glutaminsäure ——→ Ornithin ——→ Arginin) mit den primären Fixierungsprodukten verbunden sind (DAVIS und Mitarbeiter 1956). Ihre Anhäufung nach längeren Fixierungszeiten kann dadurch erklärt werden, daß beide verhältnismäßig langsam transformiert werden.

Andere Aminosäuren, die erst als späte Fixierungsprodukte auftreten, treten nicht bei allen Pilzen gleich deutlich hervor. Das gilt z.B. für das Tryptophan, das über mehrere Stufen gebildet wird, für einen der letzten Syntheseschritte aber das Vorhandensein von Serin voraussetzt. Beim Neurospora-Normalstamm erwies es sich als stark markiert; bei den beiden anderen Stämmen war der ^{14}C-Einbau in diese Verbindung nur gering.

Auch die pools einiger organischer Säuren nehmen rasch ^{14}C auf. Im Gegensatz zu den Aminosäuren bleiben sie aber nur verhältnismäßig schwach markiert. Demnach wird die Stufe der Säuren rasch durchlaufen. STOPPANI und Mitarbeiter (1958) erwähnten, daß die Markierung der Säuren bei der Hefe mit längeren Fixierungszeiten abnimmt.

Besonders deutlich ist der ^{14}C-Einbau in die Äpfelsäure. Ihre stärkere Markierung weist auf die Carboxylierung der Phosphoenolbrenztraubensäure hin (SMITH und Mitarbeiter 1961). Auch hier ist aber zu bedenken, daß in der Zelle mehrere unabhängige pools bestehen, die ihre Intermediärprodukte getrennt voneinander halten. Bei der üblichen Aufarbeitung homogenisierten Pflanzenmaterials lassen sich die Inhaltsstoffe dieser pools nicht voneinander trennen (vgl. BASSHAM und JENSEN 1967). Für die Äpfelsäure dürfen wir eine solche Ablagerung in zwei verschiedenen Reaktionsräumen der Zelle als sicher annehmen (vgl. LIPS und BEEVERS 1966a,b).

Wenn es zu Störungen im Stoffwechsel kommt, werden einzelne Säuren stärker angereichert. Das ist bei der untersuchten Neurospora-Mutante der Fall, die eine starke Markierung der Bernsteinsäure erkennen läßt. Auch sonst benahm sich dieser Stamm sehr merkwürdig. Unerklärlich bleibt seine gegenüber dem Normalstamm um den Faktor 8 gesteigerte Wachstumsgeschwindigkeit. Außerdem war sein Mycel intensiv gefärbt; offensichtlich synthetisieren die Zellen grössere Mengen von Carotinoiden (vgl. ZALOKAR 1954, 1955, RAU und Mitarbeiter 1968).

Die Einbauwege des CO_2 sind bei Autotrophen vom Zellalter abhängig. Diese Erkenntnis verdanken wir im wesentlichen der Möglichkeit, Zellsuspensionen zu synchronisieren (vgl. NIHEI und Mitarbeiter 1954, TAMIYA und Mitarbeiter 1953, PIRSON und LORENZEN 1958, SOROKIN 1965). Diese Technik wurde auf verschiedene Einzeller, so auf Chlorella (STANGE und Mitarbeiter 1960, SHKOLNIK und Mitarbeiter 1965, AHMED 1968), Skeletonema (JÖRGENSEN 1966), Chlamydomonas (KATES und JONES 1966), Dunaliella (WEGMANN 1968) u.a. angewendet. Bisher liegen nur sehr wenige Untersuchungen an Pilzen vor. LEWIS und WEINHOUSE (1951b) haben mit Aspergillus niger, ROMANO und Mitarbeiter (1967) mit

Rhizopus nigricans, STOPPANI und Mitarbeiter (1958) mit Hefezellen gearbeitet. Andere Autoren studierten keimende Sporen, so TSAY und Mitarbeiter (1965) Aspergillus, GOTTLIEB (1966) Phytophthora. Auch ohne Anwendung radioaktiven Kohlenstoffs haben KOTOV und Mitarbeiter (1965) zeigen können, daß die Aminosäurezusammensetzung verschiedener Pilze in den einzelnen Wachstumsphasen nicht konstant ist.

In den eigenen Untersuchungen an Isaria und Neurospora zeigte sich eine Parallelität zwischen ^{14}C-Einbaurate und Wachstumsgeschwindigkeit. Allein dieser Zusammenhang weist auf die Notwendigkeit des CO_2 auch für die untersuchten Pilze hin. Damit stehen diese Messungen im Einklang mit den Ergebnissen aller jener Autoren, die schon früher die Unentbehrlichkeit des Kohlendioxids für die Entwicklung heterotropher Organismen behauptet hatten (s.o.). Wenn die C-Fixierung der Pilze in deren logarithmischer Phase verhältnismäßig wenig in die wasser- und alkohollöslichen Intermediärprodukte geht, so weist dies auf einen Einbau des Kohlenstoffs in unlösliche Produkte hin. Diese Verbindungen wurden allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Erfaßt wurden allein diejenigen Inhaltsstoffe, die sich mit der angegebenen Technik extrahieren liessen. Gerade in der anfänglichen Lag-Phase sowie zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase erwiesen sich Glutaminsäure und Asparaginsäure als besonders stark markiert. Später werden diese beiden Aminosäuren offenbar rasch umgesetzt. FINCHAM (1951) fand im Myzel von Neurospora allein vier Transaminasen für den Umbau der Glutaminsäure; es muß also damit gerechnet werden, daß die zuerst auftretenden Aminosäuren einer regen Transaminierung unterworfen werden (vgl. NIEDERPRIUEM 1965). Damit werden dann auch zahlreiche jener Aminosäuren entstehen, die für die Synthese der Zellproteine benötigt werden (vgl. ABELSON und VOGEL 1955).

Während des gleichen Zeitraums sind die organischen Säuren viel schwächer markiert. Offenbar werden die primären Carboxylierungsprodukte - in erster Linie wohl die Oxalessigsäure - sehr schnell aminiert. Äpfel- und Asparaginsäure zeigen bei allen untersuchten Pilzstämmen einen gegensinnigen Verlauf. Sie scheinen damit kompetitiv aus dem Ausgangsprodukt Oxalessigsäure zu entstehen.

Einen eventuellen Einfluß der Lichtqualität auf die Einbauraten kann man nur dann nachweisen, wenn man das Alter der untersuchten Kulturen standardisiert. Um aber auszuschließen, daß ein solcher Einfluß nur auf ein ganz bestimmtes Entwicklungsstadium festzustellen ist und daß eine Untersuchung zu einem anderen Zeitpunkt zu falschen Schlußfolgerungen verleitet, wurden alle Messungen zum Lichteinfluß an zwei verschiedenen Altersstadien - während der logarithmischen und der stationären Phase - vorgenommen. Bei Autotrophen kann nach den Untersuchungen von VOSKRESENSKAYA (1956), HAUSCHILD und Mitarbeitern (1962), RIES (1967) und OGASAWARA und MIYACHI (1968) als sicher angenommen werden, daß Blaulicht die Protein-, Rotlicht die Kohlenhydratsynthese begünstigt. Wenn bei Pilzen ein ähnlicher Effekt auftreten sollte, so müssten im Rotlicht Zucker bzw. Zuckerphosphate markiert sein. Bei Heterotrophen liegen bisher nur sehr wenige Daten über einen Einfluß der Lichtqualität vor, so etwa auf die Sporangienentwicklung bei Phytophthora (HARNISH 1965, LILLY 1966) und das Wachstum von Blastocladiella (CANTINO und HORENSTEIN 1959).

Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, daß die Heterotrophen hinsichtlich ihrer unterschiedlichen ^{14}C-Fixierung im Rot- und Blaulicht weitgehend mit den Autotrophen übereinstimmen. Bei beiden Gruppen werden die Produkte der primären C_3-C_1-Fixierung gegensinnig beeinflußt.

Demnach scheint diese Carboxylierung von der Photosynthese und vom Vorhandensein des Chlorophylls unabhängig zu sein. Damit steht der Befund von TOLBERT und GAILEY (1955) im Einklang, wonach etiolierte Laubblätter Kohlenstoff vorwiegend durch diese Carboxylierungsreaktion einbauen, während sie erst unter dem Einfluß der Belichtung die Enzyme des Calvin-Cyclus aktivieren. Chlorella ellipsoidea kann im Blaulicht auch bei gehemmter Photosynthese CO_2 einbauen (OGASAWARA und MIYACHI 1968). Ganz offensichtlich wird diese - für die Proteinsynthese wichtige (SPLITTSTOESSER 1966) - Carboxylierung der Phosphoenolbrenztraubensäure auch bei Pilzen durch Licht gefördert.

CANTINO und HORENSTEIN (1959) hatten für Blastocladiella gefunden, daß die Myzelien im Blaulicht besser wachsen. Damit übereinstimmend wird im Licht mehr CO_2 fixiert als im Dunkeln. Im Gegensatz dazu hat EHRENBERG (1966) gefunden, daß Blaulicht das Hefewachstum hemmt. Die geringe Markierung von Glutamin- und Asparaginsäure im Rotlicht könnte prinzipiell auf eine Hemmung des Einbaus zurückgehen oder aber auf eine Förderung des Umbaus dieser beiden Aminosäuren. Da im Rotlicht weniger Protein gebildet wird, ist die zweite Alternative unwahrscheinlich. - In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von OGASAWARA und MIYACHI (1968) ist der Einfluß der Lichtfarbe in der logarithmischen Phase deutlicher ausgeprägt als in der stationären Phase.

Bei Neurospora ist - insbesondere nach Rotlicht-Bestrahlung - die Fraktion Glycin-Serin stark markiert. WANG und WAYGOOD (1962) sowie WANG und BURRIS (1963) fanden bei autotrophen Zellen, daß diese beiden Aminosäuren für die Kohlenhydratsynthese verwendet werden können. Mit der Serinsynthese kann auch eine stärkere Tryptophan-Synthese gekoppelt sein. Auch andere Amino-

säuren können unterschiedliche Fixierungsraten zeigen. Insbesondere kann durch eine Mutation das Gleichgewicht der Stoffwechselwege so gestört werden, daß Cyclen in den Vordergrund treten, die sonst nur von geringer Bedeutung sind. Das gilt z.B. für das Threonin in der Neurospora-Mutante. Sie könnte über die Bernsteinsäure erfolgen ("succinylated intermediate product", vgl. DAVIS und Mitarbeiter 1959). Die Bernsteinsäure ist gerade in dieser Mutante außerordentlich stark markiert. Möglicherweise entstammt sie dem sonst mengenmäßig nicht sehr bedeutenden Bernsteinsäure-Ketoglutarsäure-Isocitronensäure-Cyclus (CANTINO und HORENSTEIN 1956).

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß der Kohlenstoffeinbau in Pilzmyzelien sowohl hinsichtlich seiner Rate als auch der Verteilung des ^{14}C auf die Intermediärprodukte von mehreren Faktoren abhängig ist. Ganz offensichtlich beeinflußt das Alter der Kulturen die Verwendung des eingebauten Kohlenstoffs, zum anderen läßt sich auch bei Pilzen eine Abhängigkeit des ^{14}C-Einbaus der Spektralzusammensetzung des Lichtes nachweisen. Auch bei Heterotrophen kommt es demnach zu einer lichtabhängigen Aktivierung bzw. Hemmung bestimmter Enzyme. Die bei Algen und in den Zellen höherer Pflanzen gefundenen Unterschiede sind demnach nicht an das Vorhandensein von Chlorophyll oder an den speziellen Stoffwechsel photosynthetisch tätiger Zellen gebunden. Jeder Versuch, die unterschiedliche Beeinflussung des Zellstoffwechsels durch Licht verschiedener Wellenlänge zu erklären, wird die Befunde an chlorophyllfreien Zellen zu berücksichtigen haben.

ZUSAMMENFASSUNG

An Isaria cretacea und zwei Stämmen von Neurospora crassa (Normalstamm und Arginin-heterotrophe Mutante) wurden Versuche zur Einlagerung des ^{14}C in verschiedene Zellinhaltsstoffe angestellt.

Vorversuche ergaben bei beiden Pilzarten unter den gewählten Kulturbedingungen eine ideale Wachstumskurve.

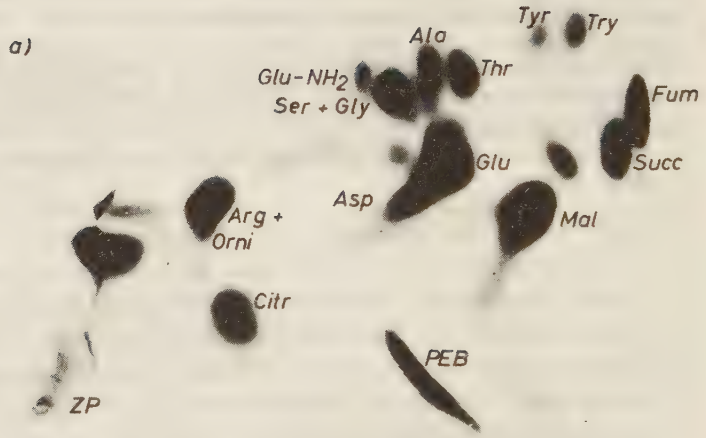
Durch Auswertung von Autoradiogrammen der wasser- und alkohollöslichen Inhaltsstoffe wurde ermittelt, in welche Verbindungen der Kohlenstoff eingelagert wird und wie sich das "Fixierungsmuster" mit zunehmender Einbauzeit ändert. Dabei ergab sich ein rascher Einbau in Asparagin- und Glutaminsäure. Auch Serin und Glycin bauen den Kohlenstoff schnell ein; andere Aminosäuren werden deutlich später markiert. Unter den organischen Säuren tritt die Äpfelsäure als frühes Fixierungsprodukt hervor.

Ein Vergleich der ^{14}C-Fixierung in den verschiedenen Wachstumsphasen zeigte eine starke Zunahme der Einbaurate während der logarithmischen Phase. Während der einzelnen Entwicklungsstadien sind die "Einbaumuster" unterschiedlich.

Belichtung hat einen deutlichen Einfluß sowohl auf die Höhe der ^{14}C-Gesamtfixierung als auch auf die Verteilung des Kohlenstoffs auf die verschiedenen Zellinhaltsstoffe. Auffällig ist ein starker Einfluß der Lichtqualität: Blaulicht begünstigt den ^{14}C-Einbau in die Aminosäuren; im Rotlicht erweist sich die Äpfelsäure als stärker markiert.

Die untersuchte Neurospora-Mutante zeigt gegenüber dem Normalstamm verschiedene Besonderheiten: Auffällig ist die starke Markierung der Bernsteinsäure. Auch das Threonin baut ungewöhnlich viel ^{14}C ein; dagegen ist das Tryptophan nur schwach radioaktiv.

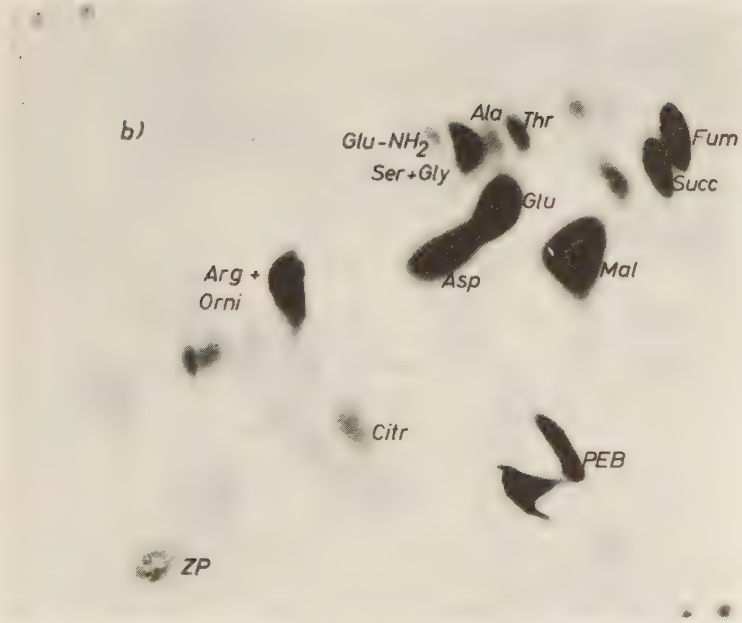
Die Einflüsse des Kulturalters und der Belichtung auf die Gesamtfixierung und die Einbauwege des Kohlenstoffs werden diskutiert.



Radioautogramm Ia:

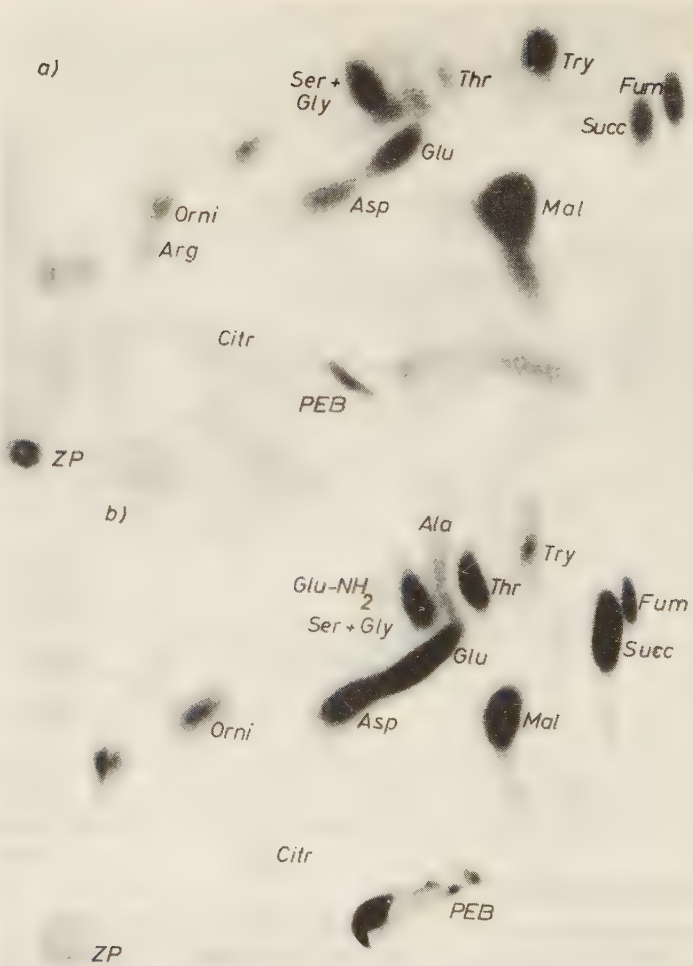
Intermediärprodukte in der löslichen Fraktion nach $^{14}CO_2$-Fixierung in Isaria cretacea. Alter der Kultur: 1 Tag. (Einzelheiten vgl. im Text).

Ala	Alanin	Ser+Gly	Serin + Glycin
Arg+Orni	Arginin + Ornithin	Succ	Bernsteinsäure
Asp	Asparaginsäure	Thr	Threonin
Citr	Citronensäure	Try	Tryptophan
Fum	Fumarsäure	Tyr	Tyrosin
Glu	Glutaminsäure	ZP	Zuckerphosphate
Glu-NH_2	Glutamin		
Mal	Äpfelsäure		
PEB	Phosphoenolbrenz-traubensäure		



Radioautogramm Ib:

Intermediärprodukte in der löslichen Fraktion nach der $^{14}CO_2$-Fixierung in Isaria cretacea.
Alter der Kultur: 4 Tage. (Einzelheiten vgl. im Text; Abkürzungen wie in Radioautogramm Ia).

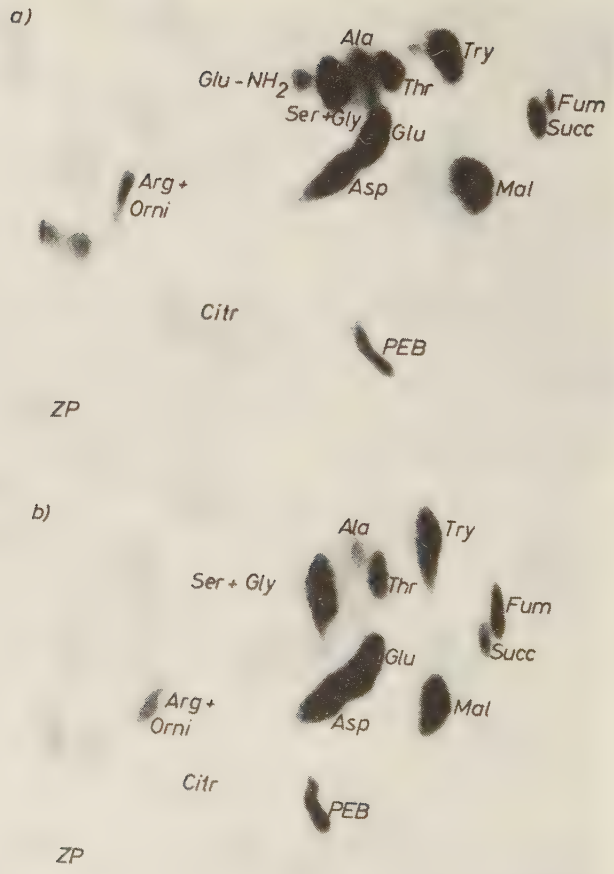


Radioautogramme IIa,b:

Intermediärprodukte in der löslichen Fraktion nach der $^{14}CO_2$-Fixierung in Neurospora crassa.
Alter der Kultur: 2 Tage
a) Normalstamm
b) Arginin-heterotrophe Mutante
(Einzelheiten vgl. im Text; Abkürzungen wie in Radioautogramm Ia).

Radioautogramme IIIa,b:

Intermediärprodukte in der löslichen Fraktion nach der $^{14}CO_2$-Fixierung in Isaria cretacea.
Alter der Kultur: 6 Tage. Die Fixierung war unter
a) Rotlicht
b) Blaulicht
(Einzelheiten vgl. im Text; Abkürzungen wie in Radioautogramm Ia).



Radioautogramme IVa,b:

Intermediärprodukte in der löslichen Fraktion nach $^{14}CO_2$-Fixierung in Neurospora crassa (Normalstamm). Alter der Kultur: 4 Tage. Die Fixierung war unter

a) Rotlicht

b) Blaulicht

(Einzelheiten vgl. im Text; Abkürzungen wie in Radioautogramm Ia).

LITERATUR

ABELSON, P.H and H.J. VOGEL: Amino acid biosynthesis in Torulopsis utilis and Neurospora crassa.
J. Biol. Chem. 213, 255-364 (1955)

AHMED, A.M.M.: Veränderungen der $^{14}CO_2$-Fixierung im Entwicklungscyclus der Chlorella pyrenoidosa.
Diss. Tübingen 1968

BASSHAM, J.A. and M. CALVIN: The Path of Carbon in Photosynthesis.
Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J. (1957)

BASSHAM, J.A. and M. CALVIN: The Photosynthesis of Carbon compounds. W.A. Benjamin Co., New York, N.Y. (1962)

BASSHAM, J.A. and R.G. JENSEN: Photosynthesis of carbon compounds in "Harvesting the sun, Photosynthesis in plant life"
edited by A. San Pietro, F.A. Greev and T.J. Army
Acad. Press New York, London, 79-110 (1967)

BENSON, A.A. and M. CALVIN: The dark reduction of photosynthesis
Science 105, 648-649 (1947)

BÜNNING, E.: Phototropismus und Carotinoide. I. Phototropische Wirksamkeit von Strahlen verschiedener Wellenlänge und Strahlungsabsorption im Pigment bei Pilobolus.
Planta 26, 719-736 (1937)

BÜNNING, E.: Phototropismus und Carotinoide. III. Weitere Untersuchungen an Pilzen und höheren Pflanzen.
Planta 27, 583-610 (1938b)

CANTINO, E.C. and E.A. HORENSTEIN: The stimulatory effect of light upon growth and CO_2-fixation in Blastocladiella. I. The S.K.I.-cycle.
Mycologia 48, 777-799 (1956)

CANTINO, E.C. and E.A. HORENSTEIN: The stimulatory effect of light upon growth and CO_2-fixation in Blastocladiella. III. Further studies in vivo and in vitro.
Physiol. plantarum 12, 251-263 (1959)

CRUICKSHANK, I.A.M.: Environment and sporulation in phytopathogenic fungi. IV. The effect of light on the formation of conidia of Peronospora tabacina.
Adam. Australian J. Biol. Sci. 16, 88-98 (1963)

DAVIS, J.W., V.H. CHELDELIN, B.E. CHRISTENSEN and C.H. WANG: Carbon dioxide fixation and biosynthesis of amino acids in yeast.
Biochim. Biophys. Acta 21, 101-105 (1956)

DAVIS, B.D., H.L. KORNBERG, A. NAGLER and E. MINGIOLI: Formation and functions of succinate in Escherichia coli.
Federation Proc. 18, 211 (1959)

DOMAN, N.J.: Pathways of carbon photoassimilation in Chloropseudomonas ethylicum.
Proceedings of the International Congress of Photosynthesis Research, Freudenstadt (1968), (im Druck).

EHRENBERG, M.: Wirkung sichtbaren Lichtes auf Saccharomyces cerevisiae. I. Einfluß verschiedener Faktoren auf die Höhe des Lichteffektes bei Wachstum und Stoffwechsel.
Arch. Mikrobiol. 54, 358-373 (1966)

FINCHAM, J.R.S.: Transaminases in Neurospora crassa.
Nature 168, 957-958 (1951)

GAFFRON, H., E.W. FAGER and A. BROWN: The ^{14}C-labeled products of the aerobic and anaerobic light and dark reactions of photosynthesis as fractionated with benzin alkohol, in "Plant metabolism and Photosynthesis";
Symposium on the uses of isotopes in biology and medicine, University of Wisconsin, Madison (1947)

GALSTON, A.W. and R.S. BAKER: Studies on the physiology of light action. II. The photodynamic action of riboflavin.
Am. J. Bot. 36, 773-780 (1949)

GOLDSTEIN, S.: Studies of a new species of Thraustochytrium that displays light stimulated growth.
Mycologia 55, 799-811 (1963)

GOTTLIEB, D.: Biosynthetic processes in germinating spores in "The fungus spore".
Colston papers No. 18 edited by M.F. Madelin, 217-233 (1966)

HARNISH, W.N.: Effect of light on production of oospores and sporangia in species of Phytophthora.
Mycologia 57, 85-90 (1965)

HAUSCHILD, A.H.W., C.D. NELSON and G. KROTKOV: The effect of light quality on the products of photosynthesis in green and blue-green algae and in photosynthetic bacteria.
Canad. J. Bot. 40, 1619-1630 (1962)

JÖRGENSEN, E.G.: Photosynthetic activity during the life-cycle of synchronous Skeletonema cells.
Physiol. plantarum 19, 789-799 (1966)

KANAI, R., S. MIYACHI, A. TAKAMIYA: Knallgas reaction-linked fixation in an autotrophic Streptomyces.
Nature 188, 873-875 (1960)

KATES, J.R. and R.F. JONES: Pattern of CO_2-fixation during vegetative development and gametic differentiation in Chlamydomonas reinhardtii.
J. Cell. Physiol. 67, 101-106 (1966)

KOTOV, V.B., S.A. KONOVALOV and A.K. OVCHAROV: Study of the intracellular aminoacids and amino acid composition of protein in strains of Aspergillus usamii.
Mikrobiology 34, 833-836 (1965)

LEWIS, K.F. and S. WEINHOUSE: Assimilation of carbon dioxide in oxalate and citrate by Aspergillus niger.
J. Am. Chem. Soc. 73, 2906-2909 (1951b)

LILLY, V.G.: The effects of sterols and light on the production and germination of Phytophthora spores. In "The fungus spores".
Coloston papers No. 18 edited by M.F. Madelin 259-272 (1966)

LIPS, S.H. and H. BEEVERS: Compartmentation of organic acids in corn roots. I. Differential labeling of 2 malate pools.
Plant Physiol. 41, 709-712 (1966a)

LIPS, S.H. and H. BEEVERS: Compartmentation of organic acids in corn roots. II. The catoplasmic pool of malic acid.
Plant Physiol. 41, 713-717 (1966b)

MANNING, W.J. and D.F. CROSSAN: Effect of particular soil bacterium on sporangial production in Phytophthora cinnamomi in liquid culture.
Phytopathology 56, 235-237 (1966)

MENZIES, J.D.: A dipper technique for serial dilution of soil for microbial analysis.
Proc. Soil Sci. Soc. Amer. 12, 660 (1957)

METZNER, H.: Zur Messung der $^{14}CO_2$-Aufnahme in pflanzliche Zellen.
Revue roumaine de Biologie (1968), (im Druck)

MOUBASHER, A.H.: Selective effects of fumigation with carbon disulphide on the soil fungus flora.
Trans. Brit. Mycol. Soc. 46, 338-344 (1963)

NIEDERPRIUEM, D.G.: Carbohydrate metabolism. 2-Tricarboxylic acid cycle in "The Fungi" Vol. I edit. by G.C. AINSWORTH and A.S. SUSSMAN
Acad. Press, New York, London, 269-300 (1965)

NIHEI, T., T. SASA, S. MIYACHI, K. SUZUKI and H. TAMIYA: Changes of photosynthetic activity of Chlorella cells during the course of their life-cycle.
Arch. Microbiol. 21, 155-164 (1954)

OGASAWARA, N. and S. MIYACHI: Wavelength effect on $^{14}CO_2$-Fixation in CMU-treated algal cells.
Proceedings of the International Congress of Photosynthesis Research, Freudenstadt, Germany (1968), (im Druck)

PIRSON, A. und H. LORENZEN: Photosynthetische Sauerstoffentwicklung von Chlorella nach Synchronisation durch Licht-Dunkel-Wechsel.
Naturwiss. 45, 497 (1958)

RAU, W., I. LINDEMANN und A. RAU-HUND: Untersuchungen über lichtabhängige Carotinoidsynthese. III. Die Farbstoffbildung von Neurospora crassa in Submerskultur.
Planta 80, 300-306 (1968)

RIES, E.: Einfluß von Rot- und Blaulicht auf den Kohlenstoffeinbau in frühe Intermediärprodukte der Photosynthese.
Diplomarbeit, Tübingen (1967)

RIPPEL, A. und H. BORTELS: Vorläufige Versuche über die allgemeine Bedeutung der Kohlensäure für die Pflanzenzelle (Versuche an Aspergillus niger).
Biochem. Z. 184, 237-244 (1927)

ROCKWELL, G.E. and J.H. HIGHBERGER:
J. Infect. Diseases 40, 438-446 (1927)

ROMANO, A.H., M.M. BRIGHT and W.E. SCOTT: Mechanism of fumaric acid accumulation in Rhizopus nigricans.
J. Bacteriol. 93, 600-604 (1967)

SAGROMSKY, H.: Lichtinduzierte Ringbildung. IV. Nachklingen der Rhythmik bei Trichothecium roseum.
Ber. Deut. Botan. Ges. 72, 169-175 (1959a)

SHKOLNIK, R.Y., N.J. DOMAN, K.S. SPEKTOROV and E.A. LINKOVA: Intermediate photosynthesis products of a synchronous culture of Chlorella pyrenoidosa at different developmental stages.
Dok. Akad. Nauk. SSSR 161, 1231-1234 (1965)

SIEFERMANN, D.: Plastidenpigmente der Langtagpflanze Lemna gibba L. im Kurz- und im Langtag.
Staatsexamensarbeit, Tübingen (1967)

SMITH, D.C., J.A. BASSHAM and M. KIRK: Dynamics of photosynthesis of carbon compounds. II. Amino acid-synthesis.
Biochim. Biophys. Acta 48, 299-313 (1961)

SOROKIN, C.: Photosynthesis in cell development.
Biochim. Biophys. Acta 94, 42-52 (1965)

SPLITTSTOESSER, W.A.: Dark-CO_2-fixation and its role in the growth of plant tissue.
Plant Physiol. 41, 755-759 (1966)

STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie, Springer-Verlag Berlin (1967)

STANGE, L., E.L. BENNET and M. CALVIN: Short-time-$^{14}CO_2$-incorporation experiments with synchronously growing Chlorella cells.
Biochim. Biophys. Acta 37, 92-100 (1960)

STOPPANI, A.O.M., S.L.S. de FAVELUKES, L. CONCHES and F.L. SACERDOTE: Mechanism of carbon dioxide fixation by Saccharomyces cerevisiae.
Biochim. Biophys. Acta 26, 443-445 (1957)

STOPPANI, A.O.M., L. CONCHES, S.L.S. de FAVELUKES and F.L. SACERDOTE: Assimilation of carbon dioxide by yeast.
Biochem. J. 70, 438-455 (1958)

TABAK, H.H. and W.B. COOKE: The effects of gaseous environments on the growth and metabolism of fungi.
Bot. Review 34, 126-252 (1968)

TABER, W.A. and L.C. VINING: Studies on Isaria cretacea. Nutritional and morphological characteristics of two strains and morphogenesis of the synnema.
Canad. J. Microbiol. 5, 513-535 (1959)

TAMIYA, H., I. IWAMURA, K. SHIBATA, E. HASE and T. NEHEI: Correlation between synthesis and light-independent metabolism in the growth of Chlorella.
Biochim. Biophys. Acta 12, 23-40 (1953)

TOLBERT, N.E. and F.B. GALLEY: Carbon dioxide fixation by etiolated plants after exposure to white light.
Plant Physiol. 30, 491-499 (1955)

TSAY, Y., A. NISHI and T. YANAYGITA: Carbon dioxide fixation in Aspergillus oryzae conidia at the initial phase of germination.
J. Biochem. 58, 487-493 (1965)

VOSKRESENSKAYA, N.P.: Formation of organic acids and amino acids in photosynthesis in various conditions of illumination.
Fiziol. Rastenii, Akad. Nauk. SSSR 3, 49-57 (1956)
Zitiert nach Chem. Abstr. 50, 7962d

WANG, D. and R.H. BURRIS: Carbon metabolism of ^{14}C-labeled amino acids in wheat leaves. II. Serine and its role in glycin metabolism.
Plant Physiol. 38, 430-439 (1963)

WANG, D. and E.R. WAYGOOD: Carbon metabolism of ^{14}C-labeled amino acids in wheat leaves. I. A pathway of glyoxylate-serine metabolism.
Plant Physiol. 37, 826-832 (1962)

WATSON, R.D.: Soil washing improves the value of the soil dilution and the plate count method of estimating populations of soil fungi.
Phytopathology 50, 792-794 (1960)

WEGMANN, K.: Der Weg des Kohlenstoffs bei der Photosynthese und Dunkelfixierung in Dunaliella spec.
Diss., Tübingen (1968)

WOOD, H.G. and M.F. UTTER: The role of carbon dioxide fixation in metabolism.
Essays in Biochem. 1, 1-27 (1965)

YANAGITA, T.: Biochemical aspects on the germination of conidiospores of Aspergillus niger.
Arch. Mikrobiol. 26, 329-344 (1957)

ZALOKAR, M.: Studies on biosynthesis of carotinoids in Neurospora crassa.
Arch. Biochem. 50, 71-80 (1954)

ZALOKAR, M.: Biosynthesis of carotinoids in Neurospora. Action spectrum of photoactivation.
Arch. Biochem. 56, 318-325 (1955)

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. H. METZNER,

möchte ich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit herzlichen Dank sagen.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst sei auch hier für das sechsmonatige Stipendium gedankt.

LEBENSLAUF

Am 23. September 1938 wurde ich, Farida Tawfik EL-HISSY, in Kafr El-Tera, Dakahlia (Ägypten), geboren. Nach den Volksschuljahren besuchte ich die Primarschule, später bis zur Schlußprüfung (Abitur) im Jahre 1957 die Oberschule in El-Mansoura.

Von 1957 - 1962 studierte ich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Kairo, wo ich mein B.Sc.-Examen (Botanik/Chemie) ablegte. In den Jahren 1962 bis 1965 war ich als Assistentin am Botanischen Institut der Universität Assiut tätig, wo ich unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Moubasher über Bodenpilze arbeitete.

Seit dem Wintersemester 1965/1966 setzte ich mein Studium an der Universität Tübingen fort. Hier arbeitete ich seit dem Wintersemester 1966/1967 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. METZNER im Institut für Chemische Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen an meiner Dissertation "Untersuchungen über Alters- und Lichtabhängigkeit des Kohlenstoffeinbaus in Pilzmyzelien".

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten in Ägypten: Abd El-Aziz, Abou Raya, Kassas, Moubasher, Mougahid, Moustafa, Said, Tolba, Vivi Täckholm, in Deutschland: Bayer, Bünning, Löffler, Metzner, Müller und Zähner.

Farida Tawfik El-Hissy

Foto-Druck
Chemoprint OHG
Gießen